



Determinação da Vida Útil de Pastéis Sortidos

Carla Sofia Santos Marques

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito.

Co-orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente.

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2011

Agradecimentos

Terminado este trabalho quero expressar os mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que me apoiaram durante a sua elaboração:

À minha orientadora, Professora Doutora Luísa Brito, por toda a disponibilidade e simpatia demonstrada e todo o incansável apoio prestado deste o primeiro dia de estágio, Por todos os conhecimentos que me transmitiu e infinitas dúvidas que esclareceu, pelos conselhos e incentivos que me deu, pela preciosa ajuda na revisão de todo o trabalho e por tudo aquilo que fez para que este trabalho decorresse sempre da melhor forma possível.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Suzana Ferreira Dias, por ter aceite co-orientar este estágio relativo à parte de análise sensorial, pela simpatia e amizade.

À Engenheira Ana Carla Silva, por toda a ajuda, disponibilidade e simpatia durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais agradeço e dedico este trabalho, pois sem o seu carinho, ajuda, compreensão e incentivo nunca teria percorrido o caminho que me permitiu chegar à elaboração desta tese. Ao meu irmão e à minha avó por toda a amizade e apoio incondicional.

Aos meus grandes amigos, que apoiaram nos bons e nos maus momentos e eles sabem quem são. À Ana Margarida que tanta falta faz em Portugal. Aos meus colegas e amigos de faculdade que tive muito gosto em conhecer.

Aos meus familiares e a todos aqueles que de várias formas me têm acompanhado e contribuído, não só para a concretização desta etapa, mas também para o meu desenvolvimento pessoal.

A TODOS UM MUITO OBRIGADO!

Resumo

O presente trabalho foi realizado para uma empresa de referência no sector de retalho alimentar e teve como finalidade estudar a vida útil de quatro tipos de pastéis sortidos: Bolo de arroz, Mil folhas, Palmier recheado e Jesuíta.

Os bolos, após descongelação, foram armazenados a uma temperatura de 20 °C e humidade relativa de 80%, até quatro dias. Terminados estes períodos, foram sujeitos a testes microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.

Os valores microbiológicos obtidos foram comparados com os valores guia do INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração.

O Mil folhas e o Palmier recheado apresentaram valores de parâmetros microbiológicos não satisfatórios ($> 10^4$ UFC de microrganismos a 30 °C/g), ao fim de 0 e 24 h, respectivamente, pelo que não foram analisados a nível sensorial. Apenas o Bolo de arroz e o Jesuíta apresentaram qualidade microbiológica que permitiu a realização da análise sensorial estas provas.

Da análise estatística efectuada às respostas dadas pelo painel de provadores, concluiu-se que, para ambos os tipos de bolos analisados, as amostras do dia zero e com 24 horas após descongelação, eram sensorialmente idênticas, com um risco de erro de 5%, enquanto que os mesmos bolos com mais tempo, após descongelação, apresentavam diferenças significativas dos bolos do dia zero e com 24 horas. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, de modo a não perderem qualidade e aceitabilidade pelo consumidor, o consumo do Bolo de arroz e do Jesuíta, aqui analisados, deverá ser efectuado, no máximo, 24 horas após o seu descongelamento.

Palavras-chave: produtos de padaria e pastelaria, tempo de vida útil, microrganismos patogénicos, qualidade e segurança alimentar e análise sensorial.

Abstract

This work was carried out for a benchmark company in the food retail sector and aimed to study the shelf-life of four types of assorted pastries: Bolo de arroz, Mil folhas, Palmier recheado and Jesuíta.

The cakes were stored after thawing at a temperature of 20 °C and humidity of 80% up to four days. After these periods the cakes were subjected to microbiological, physical-chemical and sensorial analysis.

The values obtained were compared with the INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) microbiological values guide for assessing the microbiological quality of ready to eat food prepared in catering establishments.

The Mil folhas and the Palmier recheado presented no satisfactory values ($> 10^4$ CFU of microorganisms at 30 °C/g) for the microbiological parameters, so they were not analyzed at the sensorial level. Only the Bolo de arroz and the Jesuíta had microbiological quality that allowed the realization of these tests.

From the statistical analysis performed on the answers given by the list of tasters, it was concluded that, after thawing the cakes, the zero-day's samples and the 24 h samples were sensorially similar with $p>0.05$, while the cakes with more time after thawing showed significant differences. The results obtained in the present work allow to conclude that, in order not to lose quality and consumer acceptability, consumption of the Bolo de arroz and Jesuíta analysed here, should be made no later than 24 hours after its thawing.

Keywords: bakery an pastry products, shelf-life, pathogenic microorganisms, quality and food safety, sensory analysis.

Extended Abstract

The shelf-life of one product depends on several factors that affect the microbial growth in food. Consequently, the association of these factors determines the nature of food spoilage and the risks to human health. So it is essential to collect scientific and technical information to allow us to know how the food evolve over the time and detect the moment when they lose their quality and safety characteristics.

The main changes that occur in bakery and pastries products are of microbiological origin, chemistry and physics. The microbiological problems occur in the intermediate products with high humidity. However, the chemical and physical deterioration limit the shelf-life of products with low to intermediate moisture. These changes will influence the microbiological and sensory quality of the products, factors that relate to each other. The most important factors are the a_w , pH and moisture in the food, but also the temperature and relative humidity of storage, packaging material and the atmosphere. All these factors are important and may limit microbial growth, but it is usually a combination of them that determines whether the microbial growth will occur and, given the growing conditions, how quickly it will occur.

This work was carried out for a benchmark company in the food retail sector and aimed to study the shelf-life of four types of assorted pastries: Bolo de arroz, Mil folhas, Palmier recheado and Jesuíta.

The cakes were stored after thawing at a temperature of 20 °C and humidity of 80% up to four days. After these periods the cakes were subjected to microbiological, physical-chemical and sensory analysis.

The first part of the present work consisted on microbiological analysis of the products, during four consecutive days after thawing in order to assess the microbiological quality and safety of the cakes. The analysis of the obtained results was made based on the values proposed by the INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) microbiological values guide for assessing the microbiological quality of ready to eat food prepared in catering establishments. The Mil folhas and Palmier recheado presented non satisfactory values for the microbiological parameters ($> 10^4$ CFU of microorganisms at 30 °C/g), so they were not analyzed at sensorial level. Only the Bolo

de arroz and the Jesuíta had microbiological quality that allowed the realization of these tests.

The second part of the work consisted on physico-chemical analysis (pH and humidity), in order to assess which cakes are more susceptible to the microbiological growth.

In the last stage of this work the cakes that showed good microbiological quality were analyzed sensorially, in order to access the acceptability of the product by the consumers. For this analysis an internal list of tasters of the company was used.

From the statistical analysis performed on the answers given by the list of tasters, it was concluded that, after thawing the cakes, the zero-day's samples and the one-day's samples were sensorially similar with $p>0.05$, while the cakes with more time after the thawing showed significant differences. The results obtained in the present work allow to conclude that, in order not to lose quality and consumer acceptability, consumption of the Bolo de arroz and Jesuíta analysed here, should be made no later than 24 hours after its thawing.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo.....	V
Abstract	VII
Extended Abstract	IX
Índice de Quadros.....	XIII
Índice de Figuras.....	XV
Lista de Abreviaturas.....	XVII
1 Introdução.....	1
1.1 Produtos de Padaria e Pastelaria	1
1.1.1 <i>Classificação dos Produtos</i>	1
1.1.2 <i>Alterações nos Produtos</i>	2
1.1.3 <i>Segurança Alimentar Associada a Produtos de Padaria e Pastelaria</i>	6
1.2 Perigos Microbiológicos e Microrganismos Associados a Alimentos	7
1.2.1 <i>Indicadores e Índices de Qualidade Higiénica dos Alimentos</i>	8
1.2.2 <i>Microrganismos Mesófilos</i>	9
1.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.2.4 <i>Escherichia coli</i>	12
1.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.2.6 <i>Salmonella spp.</i>	15
1.2.7 <i>Surtos de Origem Alimentar</i>	17
1.2.8 <i>Fontes de Contaminação de Origem Alimentar</i>	18
1.3 Qualidade e Segurança Alimentar	20
1.4 Enquadramento Legislativo da Segurança Alimentar	22
1.5 Análise Sensorial	27
1.6 Tempo de Vida Útil.....	29
1.7 Enquadramento e Justificação deste Estudo	32
2 Material e Métodos	35
2.1 Caracterização das Amostras de Pastéis Sortidos	35
2.1.1 <i>Bolo de Arroz</i>	35
2.1.2 <i>Mil Folhas</i>	35
2.1.3 <i>Palmier Recheado</i>	35

2.1.4	<i>Jesuíta</i>	36
2.2	Aparelhos e Utensílios	36
2.3	Metodologia das Análises Microbiológicas.....	36
2.3.1	<i>Método Utilizado na Contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos a 30 °C</i>	38
2.3.2	<i>Método Utilizado na Contagem de Listeria monocytogenes</i>	39
2.3.3	<i>Método Utilizado na Contagem de Staphylococcus coagulase positiva</i>	40
2.3.4	<i>Método Utilizado na Contagem Escherichia coli</i>	41
2.3.5	<i>Método Utilizado na Pesquisa de Salmonella spp.</i>	43
2.4	Metodologia das Análises Físico-Químicas	45
2.5	Metodologia da Análise Sensorial	46
3	Resultados e Discussão	47
3.1	Análises Microbiológicas.....	47
3.1.1	<i>Microrganismos Aeróbios Mesófilos a 30 °C</i>	47
3.1.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	50
3.1.3	<i>Staphylococcus aureus, Escherichia coli e Salmonella spp.</i>	50
3.2	Análises Físico-Químicos	52
3.2.1	<i>Determinação do pH</i>	52
3.2.2	<i>Determinação da Humidade</i>	52
3.3	Análise Sensorial	55
4	Conclusão	61
5	Referências bibliográficas	63

Índice de Quadros

Quadro 1. Classificação por tipo de produto de padaria e pastelaria em categorias.	1
Quadro 2. Valores de a_w para o crescimento de alguns tipos de microrganismos em alimentos.	4
Quadro 3. Valores de pH para o crescimento de alguns tipos de microrganismos em alimentos.	4
Quadro 4. Temperaturas de crescimento para microrganismos mesófilos	10
Quadro 5. Factores que permitem o crescimento de <i>S. aureus</i> e a produção de enterotoxinas.	14
Quadro 6. Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica.	26
Quadro 7. Contagem de Mesófilos Totais (UFC/g) nos diferentes bolos e nos diferentes tempos, nos primeiros lotes analisados.....	47
Quadro 8. Contagem de Mesófilos Totais (UFC/g) nos diferentes bolos e nos diferentes tempos, nos segundos lotes analisados.....	49
Quadro 9. Valores médios de pH dos bolos.	52
Quadro 10. Média de água evaporada em cada amostra.	53
Quadro 11. Média da humidade em base húmida.	53
Quadro 12. Média da humidade em base seca.....	53
Quadro 13. Classificações atribuídas a cada amostra por provador ao Bolo de arroz.	56
Quadro 14. Classificações atribuídas a cada amostra por provador ao Jesuíta.	59

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição de alimentos implicados em surtos causados pelas toxinas de <i>Staphylococcus aureus</i> , na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011).....	14
Figura 2. Distribuição de alimentos implicados em surtos causados pela <i>Salmonella</i> , verificados na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011).	16
Figura 3. Surtos provocados pela <i>S. enteritidis</i> em produtos de padaria, verificados na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011).....	17
Figura 4. Distribuição do número total de casos humanos, por agente causador de surtos, verificados na UE em 2008 (Adaptado de: EFSA Journal, 2010).	18
Figura 5. Distribuição do número total alimentos implicados em surtos humanos, verificados na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011).	19
Figura 6. Esquema do descongelamento dos bolos.	37
Figura 7. Procedimento para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos.	39
Figura 8. Colónias típicas de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio PALCAM. Fonte: Biokar, 2002.....	40
Figura 9. Colónias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> Fotografia por: Carla Marques.	41
Figura 10. Colónias típicas em meio TBX de <i>Escherichia coli</i> . Fonte: Biokar, 2010....	42
Figura 11. Procedimento utilizado para contagem de <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	42
Figura 12. Colónias típicas de <i>Salmonella</i> nos meios XLD e VBM. Fotografias por: Carla Marques.	43
Figura 13. Procedimento efectuado para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	44
Figura 14. Placa incontável de mesófilos. Fotografia por: Carla Marques	48
Figura 15. Colónias de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio PALCAM. Fotografia por: Carla Marques.	50
Figura 16. Colónias pretas detectadas na detecção de <i>Staphylococcus aureus</i> , em meio selectivo BP. Fotografia por: Carla Marques	51

Lista de Abreviaturas

ANCIPA	- Associação Nacional de Comerciantes e Industriais de Produtos Alimentares
APSA	- Agência Portuguesa de Segurança Alimentar
APT	- Água Peptonada Tamponada
ASAE	- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BP	– <i>Baird-Parker</i>
EFSA	- <i>European Food Safety Authority</i>
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FSAI	- <i>Food Safety Authority of Ireland</i>
FSIS	- <i>Food Safety Inspection Service</i>
HACCP	- <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
ICMSF	- <i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
IFPRI	- <i>International Food Policy Research Institute</i>
INSA	- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISO	- <i>International Organization for Standardization</i>
MKTTn-T	- <i>Caldo Muller-Kauffman Tetratonato</i>
PCA	- <i>Plate Count Agar</i>
RVS-T	- <i>Caldo Rappaport Vassiliadis Soja Broth</i>
TBX	– <i>Tryptone-Bile-Glucuronic</i>
TS	- Triptona Sal
UE	- União Europeia
UFC	- Unidade Formadora de Colónias
WHO	- <i>World Health Organization</i>
XLD	- <i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar</i>

1 Introdução

1.1 Produtos de Padaria e Pastelaria

1.1.1 Classificação dos Produtos

Existe uma enorme gama de produtos de padaria e pastelaria. A sua classificação, a nível de supermercados, é baseada de acordo com os seus constituintes; os não doces (salgados), os doces e os recheados (Quadro 1). No entanto, podem também ser classificados em relação à gama de valores de pH e de a_w . Estes dois parâmetros são bastante importantes na classificação, para o reconhecimento do potencial de deterioração e da segurança destes produtos (Smith *et al.*, 2004).

Quadro 1. Classificação por tipo de produto de padaria e pastelaria em categorias.

Categoria dos produtos	Tipo de produto dentro de cada categoria
Não doces (salgados)	Pão rústico e pão fatiado, <i>English muffins</i> , <i>crumpets</i> , <i>croissants</i> , base de <i>pizzas</i> .
Doces	Bolos de fruta, bolachas, biscoitos, panquecas, <i>donuts</i> , <i>American muffins</i> .
Produtos recheados	Tarte de frutas, folhados de salsicha, <i>pizza</i> , <i>quiche</i> , bolos com creme (Palmier recheado, Mil folhas).

(Adaptado de Smith *et al.*, 2004)

Relativamente ao pH, os produtos de padaria são classificados em três grupos distintos: os produtos ácidos com um pH inferior a 4,6; os produtos pouco ácidos com um pH entre 4,6 e 7 e os produtos não ácidos ou alcalinos com um pH superior a 7 (Smith *et al.*, 2004).

Quanto à a_w , existem também três categorias de classificação para estes produtos: os de baixa humidade ($a_w < 0,6$), onde se enquadram os biscoitos e os *crackers*; os de humidade intermédia ($0,6 < a_w < 0,85$) onde se inserem os folhados doces, os bolos recheados, *donuts* com cobertura de chocolate e os de humidade alta ($a_w > 0,86$) que inclui produtos como o pão e os *cheese cake*, entre outros (Smith *et al.*, 2004).

1.1.2 Alterações nos Produtos

As principais alterações que ocorrem nos produtos de padaria e de pastelaria são de origem microbiológica, química e física (Smith *et al.*, 2004). Os problemas microbiológicos acontecem nos produtos de humidade intermédia a elevada. No entanto, a deterioração física e química limitam a vida de prateleira dos produtos com humidade baixa a intermédia. Estas alterações vão influenciar a qualidade microbiológica e sensorial dos produtos, por factores que se relacionam entre si. Os factores de maior importância são a a_w , o pH e a humidade dos alimentos, mas também a temperatura e a humidade relativa de armazenamento, o material e a atmosfera de embalagem (Hozová *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004;). Todos estes factores são importantes e podem limitar o crescimento microbiano, mas geralmente é a combinação deles que determina se o crescimento irá ocorrer e, dadas as condições de crescimento, com que velocidade irá ocorrer (Hayes, 1995).

No Quadro 2 podemos observar alguns tipos de microrganismos e os seus valores de crescimento relativos ao a_w , bem como no Quadro 3 à gama de valores de pH.

Alterações Microbiológicas

As alterações microbiológicas são as que mais influenciam a vida útil nos produtos de padaria e pastelaria (Hozová *et al.*, 2002).

De acordo com Smith *et al.* (2004), o factor de maior importância no crescimento microbiano nos produtos de pastelaria é a a_w . A a_w mínima para o crescimento microbiano é de 0,6. Para valores inferiores não se verificam problemas de crescimento microbiano. Nos produtos de a_w intermédio (0,6-0,85) os principais microrganismos de degradação são as leveduras osmofílicas e os bolores. Nos produtos com a_w elevado, existe crescimento de quase todas as bactérias, bolores e leveduras (Smith, 1992).

No caso das alterações provocadas por bactérias, estas crescem em valores de a_w elevados. O maior problema no pão, provocado por bactérias, é o *rope* causado por *Bacillus subtilis*, bactéria formadora de esporos, que consegue sobreviver à cozedura. Estes microrganismos encontram-se geralmente em ingredientes crus, como a farinha, o fermento e o açúcar. Durante o seu crescimento, o miolo do pão torna-se descorado e pegajoso, devido à degradação do amido e das proteínas (Smith, 1992). Os produtos não recheados podem sofrer uma deterioração semelhante à do pão (Smith *et al.*,

2004). No entanto, estes estão também sujeitos a outros tipos de alterações microbianas. Muitos tipos de recheio permitem o crescimento de bactérias patogénicas, principalmente os que contêm ovos, leite e derivados (Smith *et al.*, 2004). Outros aspectos sobre perigos microbiológicos serão abordados posteriormente.

Os problemas com leveduras ocorrem, principalmente, em produtos de padaria e pastelaria com humidade intermédia a elevada. Segundo Legan e Voysey (1991), os problemas com leveduras, neste tipo de produtos, podem ser divididos em duas categorias principais: o crescimento visível de leveduras nas superfícies dos produtos (manchas brancas ou rosadas) e a deterioração fermentativa de uma ampla gama de ingredientes que manifestam odores (por exemplo a álcool, éteres ou outros) associados, ou não, à produção de gás (Smith *et al.*, 2004).

Pichia burtonii é a principal levedura que causa a deterioração do pão. Em menor escala, encontra-se *Candida guilliermondii*, *Hansenula anomala* e *Debaryomyces hansenii*. A contaminação de produtos com leveduras osmofílicas, na sua maioria, resulta de utensílios e equipamentos que não foram devidamente higienizados.

A maior parte dos bolores cresce em produtos com a_w superior a 0,8, no entanto existe uma pequena parte, os bolores xerófilos, que cresce em produtos com a_w baixo, como 0,65. A deterioração por bolores origina perdas que variam entre 1% a 5% dependendo da estação do ano, sendo que nos meses quentes, nomeadamente no Verão, com temperaturas mais quentes e húmidas, o problema de crescimento dos bolores é mais acentuado. Os produtos acabados de cozer não contêm células vegetativas viáveis nem esporos, contudo, rapidamente podem ficar contaminados, em resultado das contaminações pós-cozedura, através do ar, de superfícies, de equipamentos, de ingredientes ou até mesmo pelos próprios manipuladores (Smith *et al.*, 2004).

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Quadro 2. Valores de a_w para o crescimento de alguns tipos de microrganismos em alimentos.

Microrganismos	a_w Mínimo	a_w Ótimo	a_w Máximo
<i>Campylobacter</i> spp.	0,98	0,99	-
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	0,97	-	-
<i>Shigella</i> spp.	0,97	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,97	-	-
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	0,95	0,99	-
<i>Salmonella</i> spp.	0,94	0,99	>0,99
<i>Bacillus cereus</i>	0,93	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	0,94	0,95-0,96	0,97
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92	-	-

(Adaptado de ICMSF 1996)

Quadro 3. Valores de pH para o crescimento de alguns tipos de microrganismos em alimentos.

Microrganismos	pH Mínimo	pH Ótimo	pH Máximo
<i>Clostridium perfringens</i>	5,5 – 5,8	7,2	8,0 – 9,0
<i>Bacillus cereus</i>	4,9	6,0 -7,0	8,8
<i>Campylobacter</i> spp.	4,9	6,5 – 7,5	9,0
<i>Shigella</i> spp.	4,9	-	9,3
Toxin de <i>Clostridium botulinum</i>	4,6	-	8,5
<i>Clostridium botulinum</i>	4,6	-	8,5
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	4,4	6,0 – 7,0	9,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,39	7,0	9,4
<i>Salmonella</i> spp.	4,2	7,0 – 7,5	9,5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,2	7,2	9,6

(Adaptado de ICMSF 1996)

Alterações Químicas

Os produtos de padaria e pastelaria mais susceptíveis de sofrer alterações químicas, nomeadamente rancificação, são os que apresentam um teor lipídico elevado. A rancificação dos produtos ocorre através da oxidação dos lípidos, com o desenvolvimento de maus cheiros e maus *flavours*, o que torna o produto desagradável. Desta forma, há uma diminuição da vida útil. Podem ocorrer duas formas de ranço, o hidrolítico e o oxidativo. O ranço hidrolítico advém da ausência de oxigénio como resultado da hidrólise dos triglicéridos e consequente libertação do glicerol e dos ácidos gordos responsáveis pelos maus cheiros. Este tipo de degradação é originado pela presença de humidade e de enzimas como lipases e lipoxigenases. O ranço oxidativo é resultante da quebra dos ácidos gordos insaturados pelo oxigénio, através de um mecanismo autolítico de radicais livres. Como consequência, formam-se aldeídos responsáveis por maus cheiros, cetonas e ácidos gordos de cadeia curta. Estes radicais livres e peróxidos formados durante a oxidação dos lípidos podem vir a afectar a qualidade dos alimentos, particularmente através da destruição das vitaminas A e E (Smith *et al.*, 2004).

Alterações Físicas

As alterações físicas que envolvem a perda ou o ganho de humidade resultam em alterações de textura. Contudo, podem ainda originar deterioração microbiológica ou química em produtos com teores de humidade baixo a intermédio. No entanto, estas alterações podem ser evitadas com a utilização de embalagens que sirvam de barreira aos gases ou de atmosferas modificadas (Smith *et al.*, 2004).

De acordo com Hebeda e Zobel (1996) *in* Smith *et al.* (2004), o maior problema de deterioração física neste tipo de produtos é denominado de *staling*, definido como uma qualquer pequena alteração, não microbiológica, que ocorra no pão e em outros produtos depois da cozedura, tornando-os menos aceitáveis para o consumidor.

Estudos realizados indicam que o *staling* ocorre devido à migração da água, a um nível macroscópico, da zona de maior a_w , o miolo, para a zona de menor a_w , a crosta. Logo, produtos com valores de a_w mais elevado envelhecem mais rapidamente, comparativamente aos de a_w intermédio ou baixo. No entanto, o *staling* não é consequência apenas da migração da água. Segundo Kulp (1979) *in* Smith *et al.* (2004), o grau e a taxa de cristalização dos componentes do amido, especificamente a

fracção não linear de amilopectina, são os principais responsáveis pelo *staling*. A formação de complexos entre os polímeros de amido, lípidos e proteínas do trigo podem inibir a agregação da amilose e da amilopectina. De igual forma, a composição destes constituintes pode influenciar o grau de *staling*.

Segundo Smith *et al.* (2004), os biscoitos e as bolachas têm maior percentagem de lípidos que o pão, pelo que envelhecem de forma mais lenta. Por outro lado, estes produtos, são mais passíveis de sofrer oxidação dos lípidos e de desenvolvimento de ranço.

1.1.3 Segurança Alimentar Associada a Produtos de Padaria e Pastelaria

Os produtos de padaria e pastelaria podem sofrer vários tipos de alterações que limitam a vida útil do produto, como referido anteriormente, encontrando-se envolvidos em alguns surtos de origem alimentar.

Segundo Todd (1996), em países como Portugal, a Suíça, a Polónia e a Bulgária entre 35% a 47% dos surtos de origem alimentar tinham sido provocados por produtos de padaria e pastelaria. O facto deste tipo de produtos ter causado intoxicações e infeções alimentares derivou de vários factores, desde o tipo de produto às condições de processamento. Este último factor é bastante importante, pois pode possibilitar a destruição de possíveis bactérias patogénicas presentes nas matérias-primas.

Ingredientes como frutas, cremes ou coberturas podem não sofrer um tratamento térmico adequado. Um tratamento térmico insuficiente, ou a ausência deste, pode promover o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Smith *et al.*, 2004).

As características dos ingredientes e dos produtos, nomeadamente os valores de pH e de a_w , condicionam muito o desenvolvimento bacteriano, pois muitos dos produtos de pastelaria têm valores de pH superiores a 4,6 e de a_w superiores a 0,85, condições que permitem o crescimento de bactérias patogénicas.

1.2 Perigos Microbiológicos e Microrganismos Associados a Alimentos

A preocupação com a Saúde Pública, no que se refere às doenças de origem alimentar, emergiu por volta de 1880. Embora os microrganismos tenham sido observados e descritos pela primeira vez por Leeuwenhoek em 1683, só em 1837 Pasteur fez a primeira associação entre bactérias e a alteração de alimentos. A demonstração de que as doenças podiam também ter origem nos alimentos só foi feita no século XIX (Silliker *et al.*, 1991).

Apenas no fim da década de 80 do século XIX surgiu o termo genérico “intoxicação alimentar”, antes desta designação os episódios de doenças eram descritos conforme o alimento envolvido, como intoxicação por queijo ou intoxicação por carne (Lelieveld *et al.*, 2005).

As doenças de origem alimentar provocadas por microrganismos patogénicos, continuam, nos dias de hoje, a ser um problema significativo de Saúde Pública, embora esteja a ser feito um grande esforço, por parte das entidades governamentais de todo o mundo, no sentido de promover a melhoria da segurança da cadeia alimentar. Este tipo de problema é comum a todos os países, sejam eles países desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento. Estas doenças surgem de diversas formas, podendo ser representados apenas por sintomas como uma ligeira indisposição, ou por vezes requerer cuidados médicos, podendo em alguns casos conduzir à morte (Soares, 2007). A prevenção é o factor primordial. Assim, a implementação de boas práticas vai reduzir os riscos envolvidos no aparecimento de doenças de origem alimentar.

Existem diferentes tipos de perigos sanitários que podem ser veiculados para os géneros alimentícios, os perigos biológicos, os perigos químicos e os perigos físicos, com potencial para causar efeitos adversos para a Saúde Pública. Os perigos biológicos, devem-se a contaminações por bactérias patogénicas ou potencialmente patogénicas (*Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*), por vírus (Vírus da Hepatite A, Norovírus, Rotavírus, Astrovírus) e por parasitas (*Giardia*, *Cyclospora*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Trichinella*, *Anisakis*, *Fasciola hepática*) (Bernardo, 2006).

1.2.1 Indicadores e Índices de Qualidade Higiénica dos Alimentos

Os agentes microbiológicos podem ser utilizados como índices e como indicadores microbiológicos. Num alimento, os agentes microbiológicos utilizados como índices apontam uma possível presença simultânea de microrganismos patogénicos relacionados entre si fisiologicamente. Por exemplo *E. coli* é utilizada como índice de uma possível presença de microrganismos patogénicos de origem enterica, em água e em alimentos (Mossel *et al.*, 1985).

Os indicadores microbiológicos são grupos de microrganismos que indicam má qualidade microbiológica dos alimentos em geral. Quando há indícios de má qualidade microbiológica, segundo valores de referência, significa que houve deficiências em diversos níveis, tais como matérias-primas, tratamento térmico inadequado, contaminação posterior ao tratamento ou temperatura de armazenamento inadequada.

A finalidade da determinação dos índices e indicadores microbiológicos nos alimentos é comprovar a eficiência dos tratamentos destinados a assegurar a inocuidade dos produtos alimentares, constatando que todo o processo decorreu correctamente, podendo sugerir deficiências nos processos de higienização (Mossel *et al.*, 1985). Isto é, os indicadores microbiológicos reflectem a qualidade microbiológica do alimento e, quando presentes num determinado género alimentício a níveis específicos, podem indicar o seu estado de segurança e o seu tempo de vida útil (Hui *et al.*, 2001; Jay *et al.*, 2005).

O anexo I do Regulamento (CE) nº. 2073/2005 sobre critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios tem a seguinte constituição: considera como critérios de segurança dos géneros alimentícios *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e as enterotoxinas estafilocócicas.

Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli* são consideradas como critérios de higiene dos processos, para os mais diversos alimentos como, a carne e derivados, o leite e produtos lácteos, os ovoprodutos, os produtos da pesca, os produtos hortícolas, as frutas e produtos derivados

A presença de *Salmonella* spp., num alimento pode significar que as práticas de higiene foram insuficientes durante a manipulação, que houve uma possível existência de matérias-primas contaminadas, que se efectuou um controlo inadequado da temperatura ou que existiu uma contaminação cruzada.

Staphylococcus spp., é indicador de higiene em alimentos muito manipulados. Uma contagem elevada, geralmente indica fraca higiene pessoal, higienização inadequada dos alimentos e prolongada permanência dos alimentos à temperatura ambiente. A pesquisa de *Staphylococcus* coagulase-positiva é efectuada para avaliação da concentração de toxinas de elevada estabilidade térmica (Lacasse, 2000).

1.2.2 *Microrganismos Mesófilos*

Os microrganismos mesófilos desenvolvem-se bem a temperaturas entre os 20 °C e os 45 °C e têm um crescimento óptimo entre 30 °C e 40 °C. Uma característica importante deste tipo de microrganismos é o facto de não terem capacidade de crescimento a temperaturas baixas, entre -1 °C e 5 °C (Jay, 1992).

A sua contagem tem um significado importante em Microbiologia Alimentar por ser o melhor método para avaliar a qualidade microbiológica geral dos alimentos. É um exame com particular importância no controlo industrial, porque fornece informação útil com base num método relativamente simples de realizar, embora a informação que resulta desta técnica não garanta a segurança sanitária dos produtos, o que implica uma pesquisa de organismos patogénicos.

O Quadro 4 representa as temperaturas de crescimento para algumas das bactérias mesófilas implicadas na deterioração dos alimentos e/ou na transmissão de doenças alimentares (Garbutt, 1997).

Quadro 4. Temperaturas de crescimento para microrganismos mesófilos

Microrganismos	Temperatura (°C)		
	Mínimo	Ótimo	Máximo
<i>Salmonella</i> spp.	5,3	37	45-47
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,7	37	45
<i>Clostridium perfringens</i>	20	37-45	50
<i>Clostridium botulinum</i> A/B	12,5	37-40	50
<i>Campylobacter jejuni</i>	30	42-45	47
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10	30-37	42
<i>Bacillus cereus</i>	10	28-35	48

(Adaptado de: Garbutt, 1997)

1.2.3 *Listeria monocytogenes*

As bactérias do género *Listeria* são constituídas por pequenos bacilos gram-positivos, não são formadoras de esporos, a temperaturas inferiores a 30 °C movem-se por meio de flagelos, podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas, geralmente catalase-positiva e oxidase-negativa (Adams *et al.*, 2000; Lund *et al.*, 2000).

Listeria spp. são organismos psicrotróficos, capazes de crescer a temperaturas de refrigeração, o que as torna numa preocupação para produtos com um *vida útil* prolongado e geralmente refrigerados (Lund *et al.*, 2000).

A sua capacidade de crescimento numa ampla gama de temperaturas e em ambientes ácidos, bem como na ausência, ou em quantidades muito baixas, de oxigénio, permite uma fácil multiplicação (Lund *et al.*, 2000). Está amplamente distribuída na Natureza, sendo frequentemente encontrada no solo, em águas e em vegetais. Outras fontes de contaminação podem ser humanos ou animais infectados (ICMSF, 1996; WHO, 2008). Os veículos alimentares mais comuns são o leite cru, os queijos particularmente os de pasta mole e os vegetais crus.

Este género é constituído por oito espécies antigénicamente distintas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae*. A principal espécie patogénica responsável pela maioria das infecções

em humanos é *L. monocytogenes* (Jay *et al.*, 2005). Grande parte dos casos de listeriose em humanos é provocada pelos serótipos 1/2a, 1/2b e 4b (Adams *et al.*, 2000; Leclercq *et al.*, 2009; Graves *et al.*, 2010).

Segundo Vierling and Leyral (2007), *L. monocytogenes* desenvolve-se a valores de temperatura entre os 3 °C e os 45 °C e de pH de 5,6 a 9,6. O seu crescimento é optimizado para valores entre 30 °C e 37 °C e pH de 7,2 a 7,6. Os produtos de pastelaria e os recheios utilizados, nomeadamente os refrigerados e os fabricados com produtos derivados de leite devem merecer especial atenção relativamente à possível contaminação com esta bactéria (Smith *et al.*, 2004).

L. monocytogenes ocorre em produtos com a_w igual ou superior a 0,92 e pode crescer em concentrações de 10% de NaCl (Miller, 1992 *in* FAO/WHO, 2004), conseguindo sobreviver durante um ano a pH 6 e com 16% de NaCl (Adams *et al.*, 2000).

É facilmente destruída pelo calor a uma temperatura de 55 °C, durante 30 minutos, ou a 100 °C, durante um a dois minutos.

A sua ubiquidade no ambiente pode sugerir que a exposição a *L. monocytogenes* seja frequente. No entanto, a incidência da infecção, dependendo da quantidade ingerida, da dose infecciosa e da estirpe, é baixa para a maioria da população. Porém, poderá representar um perigo de Saúde Pública para as populações de risco, como grávidas, indivíduos imunodeprimidos, recém-nascidos e idosos (Adams *et al.*, 2000).

O período de incubação da doença varia entre um dia a algumas semanas, o que torna a identificação do vector responsável pela transmissão da doença muitas vezes difícil ou mesmo impossível. Os sintomas da doença podem variar desde sintomas comuns a uma gripe, a septicemia, endocardite, encefalite, entre outros. Em mulheres grávidas é comum surgirem sintomas gripais associados a febre e cefaleias. A infecção por este tipo de bactéria pode, neste caso, afectar a placenta e conduzir a aborto ou a parto prematuro. Nos bebés, após o nascimento, ou poucos dias depois, pode ocorrer septicemia com elevada taxa de mortalidade (Adams *et al.*, 2000).

De acordo com o jornal da EFSA (2011), em 2009 foram reportados por 26 estados-membros da União Europeia 1 645 casos confirmados de listeriose, o que representou um aumento de 264 casos (19%) em relação ao ano de 2008, sendo a incidência de 0,4 casos por cada 100 000 habitantes.

1.2.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria em forma de bastonete não esporulado, gram-negativa, anaeróbia facultativa e muitas vezes móvel por flagelos, catalase-positiva e oxidade-negativa. A maioria das espécies fermenta a lactose (ICMSF, 1996). Pertence à família das *Enterobacteriaceae* e é uma bactéria típica do intestino humano e de vários animais de sangue quente (Smith *et al.*, 2004).

A maioria das estirpes é inofensiva, existem no entanto algumas estirpes patogénicas (Lacasse, 1995).

O crescimento pode ocorrer em meio mínimo contendo apenas uma fonte de carbono orgânico (glucose) e uma fonte de azoto $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Jay *et al.*, 2005). As temperaturas de crescimento variam entre os 10 °C e 50 °C, com um óptimo desenvolvimento entre 30 °C a 37 °C. O efeito do pH está dependente do tipo de ácido presente e geralmente o crescimento pode ocorrer entre valores de pH compreendidos entre 4,4 e 8,5. Relativamente ao valor de a_w , o valor mínimo de crescimento é de 0,95 em concentrações de 6% de NaCl (WHO, 2008).

As estirpes de *E. coli* podem ser classificadas em função dos genes de virulência adquiridos. São reconhecidos cinco grupos; *E. coli* enterotoxigénicas; *E. coli* enteroagregativas; *E. coli* enteropatogénicas; *E. coli* enteroinvasivas e *E. coli* enterohemorrágicas (Jay *et al.*, 2005).

Os principais sintomas caracterizam-se pelo aparecimento de dores musculares generalizadas, cefaleias e febre. A doença caracteriza-se por longos períodos de incubação, cerca de 5 a 30 dias ou mais. Algumas estirpes produzem toxinas responsáveis por sintomas como, diarreia com sangue, febres e fortes dores abdominais.

Os alimentos associados a este tipo de intoxicação geralmente são: os hambúrgueres crus ou mal cozinhados; o leite cru e os vegetais. Pode no entanto existir contaminação secundária, de indivíduo para indivíduo, se algum deles for portador deste microrganismo (WHO, 2008).

É um microrganismo bastante sensível a temperaturas elevadas, podendo ser destruído pela fervura, a 100 °C.

1.2.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, catalase-positiva, oxidase-negativa. Encontra-se na forma de cocos que se agrupam em cachos. Pertencem à família *Micrococcaceae*. Estima-se que 50% a 70% das estirpes sejam enterotoxinogênicas (Adams *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004). O envenenamento causado por enterotoxinas resulta no consumo de alimentos com concentrações aproximadamente de 10^6 UFC/g. As toxinas produzidas são bastante resistentes às temperaturas elevadas, superando valores superiores a 100 °C durante uma hora (Smith *et al.*, 2004). A doença é causada pelas enterotoxinas produzidas pela bactéria, sendo necessário apenas 0,1 a 1 µg/Kg de toxinas para causar uma intoxicação alimentar (ICMSF, 1996).

Estima-se que 30% a 50% dos humanos sejam portadores de *S. aureus*. Estas bactérias existem nas fossas nasais, na garganta, na pele, bem como no ar e na água. A maior fonte de contaminação por *S. aureus* ocorre através da manipulação dos alimentos pelos operadores e através de um armazenamento não adequado. Deste modo, a bactéria pode multiplicar-se e produzir toxinas (WHO, 2008). A contaminação pode também ocorrer por contaminações cruzadas entre alimentos, superfícies ou utensílios (Smith *et al.*, 2004).

Entre a grande variedade de alimentos que podem estar na origem da intoxicação por *S. aureus*, os que têm um papel particular nestas situações são: as carnes, os mariscos, os gelados, a maionese, os ovos e os ovoprodutos e os produtos de pastelaria (ICMSF, 1996).

Relativamente aos parâmetros de crescimento da bactéria e da produção de toxinas, estes requerem determinadas condições de temperatura, a_w e pH, como indicados no Quadro 5.

Os sintomas de intoxicação incluem: náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. Ocorrem geralmente num período curto de tempo, entre uma a oito horas após o consumo do alimento contaminado (Lund *et al.*, 2000). A severidade dos sintomas é variável, dependendo da susceptibilidade do indivíduo, da concentração de toxinas no alimento e da quantidade de alimento contaminado consumido (Smith *et al.*, 2004).

Quadro 5. Factores que permitem o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas.

Factor	Crescimento de <i>S. aureus</i>		Produção de enterotoxinas	
	Ótimo	Intervalo	Ótimo	Intervalo
Temperatura (°C)	37	7-48	40-45	10-48
pH	6,0-7,0	4,0-10	7-8	4,0-9,6
NaCl (%)	0	0-20	0	0-10
a_w	0,98	0,83-0,99	0,98	0,85-0,99

(Adaptado de: ICMSF, 1996)

Segundo o jornal da EFSA (2011) a maior proporção de surtos verificados por toxinas de *S. aureus* foi atribuída ao queijo (21,6%), seguido de refeições mistas ou *buffet* com 15,9%. Os produtos de padaria apresentavam uma percentagem de 4,5 (Fig. 1).

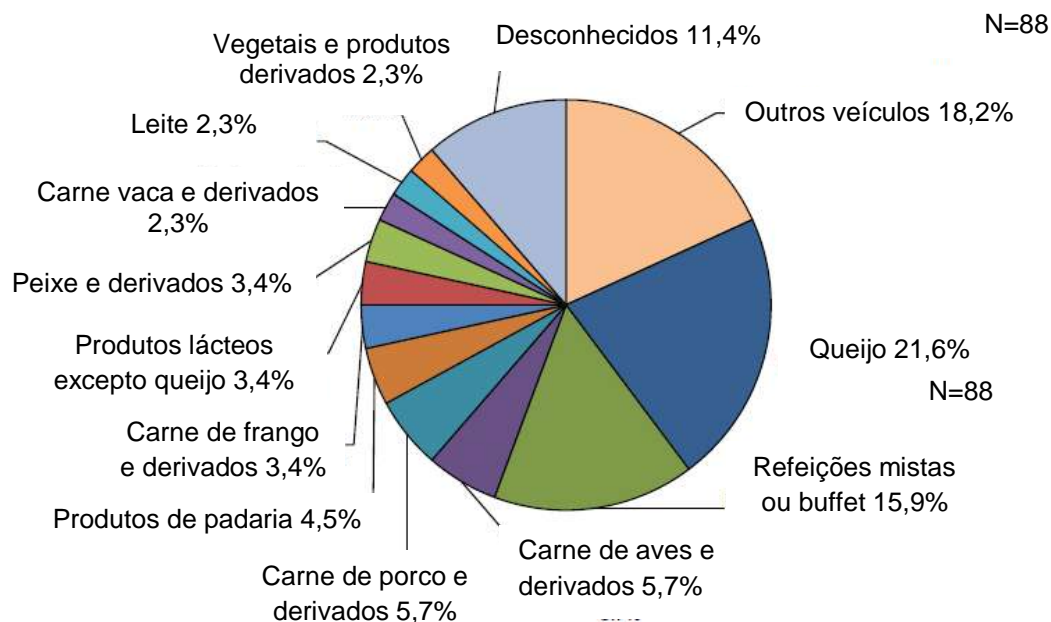


Figura 1. Distribuição de alimentos implicados em surtos causados pelas toxinas de *Staphylococcus aureus*, na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011)

1.2.6 *Salmonella* spp.

O género *Salmonella* é formado por bacilos gram-negativos que pertencem à família *Enterobacteriaceae* (Anon, 1994 in. Lund *et al.*, 2000; WHO, 2008). *Salmonella* spp. são bactérias oxidase-negativas, não esporuladas e móveis através de flagelos. Contrariamente às restantes espécies, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* não se movem e não são patogénicas para os humanos (Hui *et al*, 2001).

Existem aproximadamente 2 000 serótipos do género *Salmonella*, número que tem aumentado à medida que novas espécies vão sendo encontradas (Hayes, 1995).

As principais fontes de alimentos onde encontramos *Salmonella* spp. são a carne crua nomeadamente a de aves, os mariscos, os ovos e os produtos à base de ovos, o leite e os produtos lácteos e a água (Hui *et al*; 2001).

O intervalo de temperatura para o crescimento de *Salmonella* spp. é de 5 °C a 41 °C, com um óptimo de 38 °C (Hayes, 1995). É um género relativamente sensível ao calor, sendo eliminado a 60 °C durante 15 a 20 minutos. Não consegue crescer a temperaturas inferiores a 7 °C (Hayes, 1995). O valor de pH ideal para o crescimento é cerca de 7,0, não existindo crescimento abaixo dos 4,1, excepto o caso de *S. Newport* que pode crescer em sumo de maçã e de cidra, com um pH de 3,68. Crescem em a_w superior 0,95 (Hui *et al*, 2001).

A dose infecciosa depende da idade e do estado de saúde do indivíduo. Para um adulto saudável, este número varia entre 10^4 e 10^{10} UFC/g. Em crianças, idosos e imunodeprimidos uma quantidade de 1 a 10 UFC/100 g de alimento é a quantidade necessária para causar uma infecção (Mossel *et al.*, 1995; Jay, 2000).

Os casos de doença ocorrem quando um indivíduo ingere células de *Salmonella* que sobrevivem à passagem pelo estômago, que crescem e se multiplicam no intestino. Os sintomas são cólicas abdominais, diarreia, febre e vômitos. Podem aparecer num período de 8 a 72 horas, mas normalmente ocorrem 20 a 48 horas, após a ingestão. Períodos maiores de incubação estão relacionados com consumo de água contaminada. Os sintomas duram, aproximadamente, entre 2 a 5 dias (Mossel *et al.*, 1995; Jay, 2000). Podem ocorrer sintomas mais graves, como diarreia com muco e sangue, cólicas intensas, desidratação e convulsões, meningites, ou mesmo, a morte. Os indivíduos afectados podem excretar a bactéria durante alguns meses, raramente mais de três, embora seja possível ser portador crónico. É bastante importante, neste

período, reforçar a higiene de forma a evitar possíveis contaminações (Mossel *et al.*, 1995; Jay, 2000).

A Figura 2 mostra que os alimentos mais frequentemente implicados em surtos de *Salmonella*, em 2009, foram os ovos e os ovoprodutos representando 49,1% de todos os surtos verificados. A proporção dos surtos em 2009 causada por ovos e ovoprodutos foi maior que nos dois anos anteriores. Os produtos de padaria e pastelaria tratados termicamente por processos inadequados e que usavam ovos crus, foram a segunda causa de surtos por *Salmonella* com 10,2% (Jornal EFSA, 2011).

Dos 324 surtos ocorridos, 8 surgiram na Áustria, 1 na Bélgica, 1 na República Checa, 5 na Dinamarca, 1 na Estónia, 1 na Finlândia, 104 em França, 20 na Alemanha, 6 na Lituânia, 3 na Holanda, 95 na Polónia, 3 em Portugal, 3 na Roménia, 3 na Eslováquia, 3 na Eslovénia, 54 em Espanha e 2 na Suíça (Jornal EFSA, 2011).

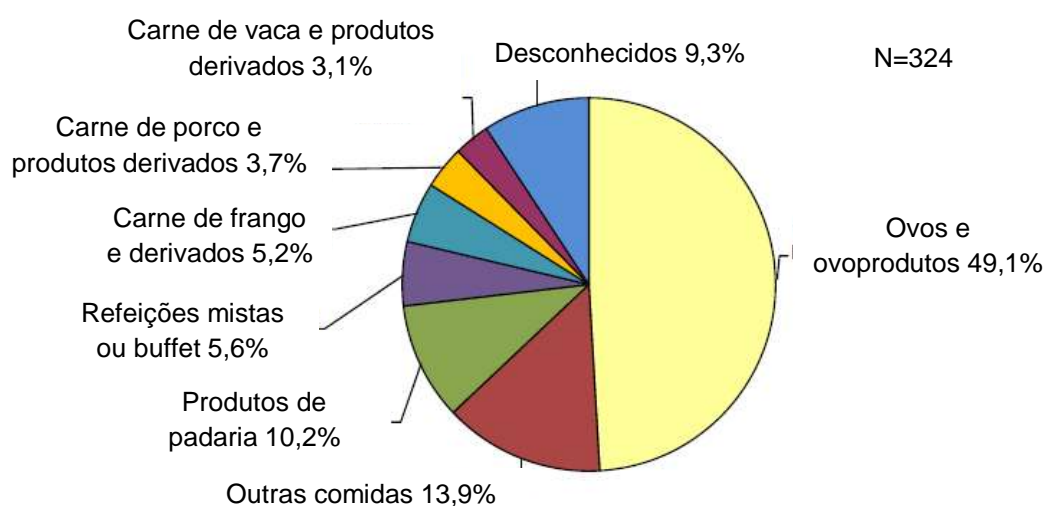


Figura 2. Distribuição de alimentos implicados em surtos causados pela *Salmonella*, verificados na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011).

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Em 32 dos 42 surtos atribuídos a produtos de panificação, 66,3% foram devidos *S. Enteritidis*. Nestes casos os alimentos continham ovo cru (Fig. 3).

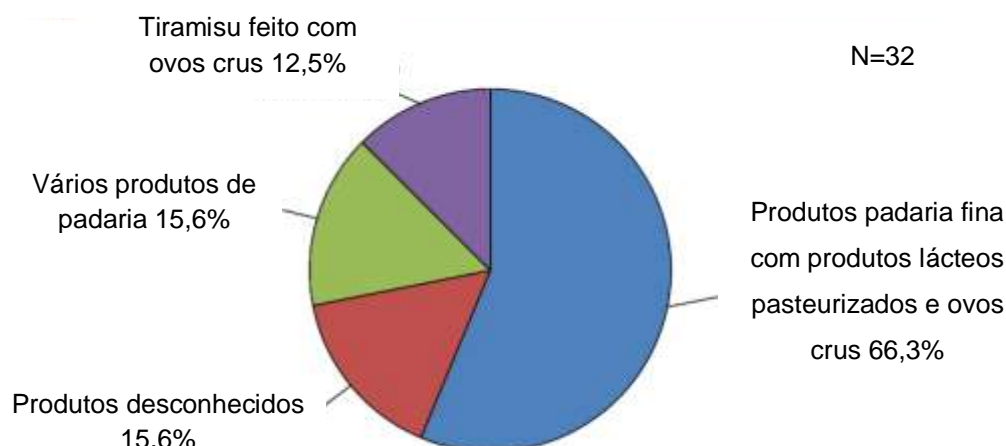


Figura 3. Surtos provocados pela *S. enteritidis* em produtos de padaria, verificados na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011).

1.2.7 Surtos de Origem Alimentar

Na UE, no ano de 2008 (Fig. 4), observou-se que os agentes responsáveis pela maioria dos casos humanos, de origem alimentar, incluíam a *Salmonella*, as toxinas bacterianas e os vírus. *Salmonella* causou 7724 casos, seguida das toxinas bacterianas com 2994 acontecimentos e dos vírus com 1162 ocorrências. Na informação referida, estão incluídos 890 casos de surtos alimentares, sendo respectivamente: 14 na Áustria, 15 na Bélgica, 1 na República Checa, 16 na Dinamarca, 5 na Estónia, 8 na Finlândia, 273 na França, 30 na Alemanha, 1 na Grécia, 35 na Hungria, 2 na Irlanda, 10 na Letónia, 12 na Lituânia, 35 na Holanda, 155 na Polónia, 11 em Portugal, 37 na Roménia, 9 na Eslováquia, 1 na Eslovénia, 214 em Espanha e 6 na Suécia. Destes, 51,2% envolveram mais de uma família, 43,7% envolveram apenas uma família e 5,1% são de origem desconhecida.

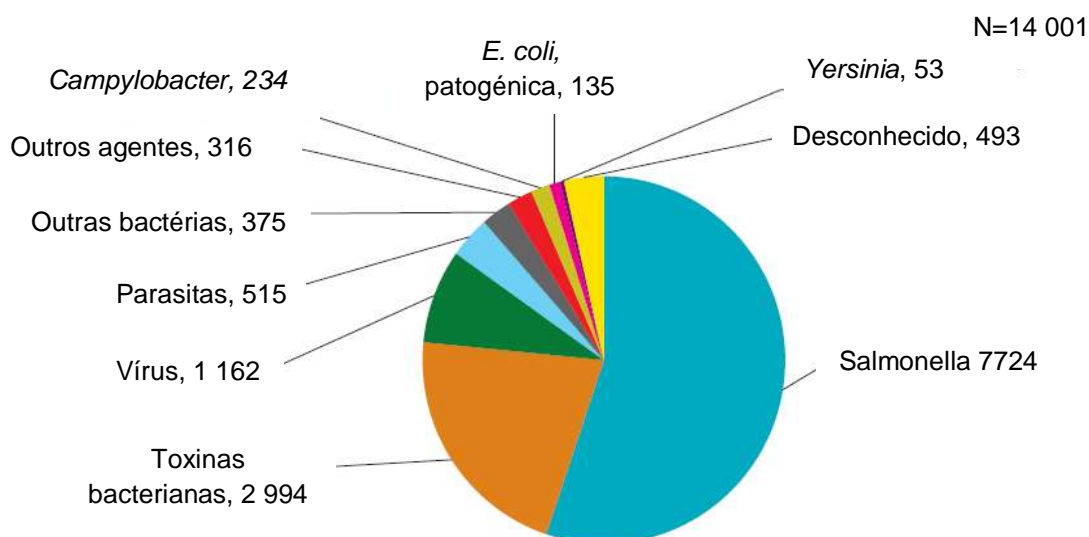


Figura 4. Distribuição do número total de casos humanos, por agente causador de surtos, verificados na UE em 2008 (Adaptado de: EFSA Journal, 2010).

Casos em Portugal

Segundo dados do jornal da EFSA (2011), os dados mais recentes reportados por Portugal referem-se ao ano de 2009. Neste ano, registaram-se 251 casos, dos quais 90 foram sujeitos a tratamentos hospitalares, tendo-se verificado ainda uma morte. Comparativamente a 2008, ano em que ocorreram 136 casos com 92 hospitalizações, verificou-se que houve um aumento significativo de casos com um ligeiro número de internamentos.

1.2.8 Fontes de Contaminação de Origem Alimentar

As fontes de contaminação de origem alimentar mais frequentes e provocadoras de doenças devem-se sobretudo a contaminações cruzadas, devido a manipulações inadequadas, ingredientes já contaminados, más condições higio-sanitárias, uma incorrecta refrigeração ou um armazenamento incorrecto e falhas no processo de controlo. Desta forma, devem ser tomadas medidas preventivas de modo a evitar doenças de origem alimentar (Soares, 2007).

Os estudos efectuados pela EFSA em 2009, referente a alimentos implicados em surtos humanos, na UE, evidenciam que os ovos e os ovoprodutos são os responsáveis pela maioria dos casos ocorridos, registando-se valores de cerca de

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

17%. O mesmo estudo apresenta valores de 8,1% para as refeições mistas e *buffet*, e 4,3% para os produtos de padaria (Fig. 5).

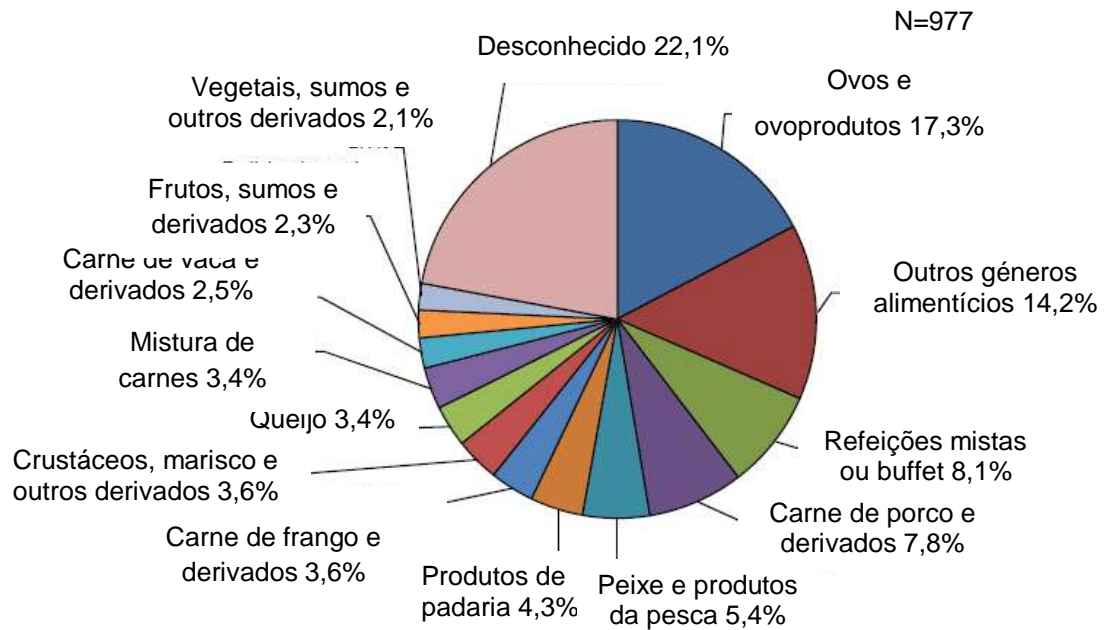


Figura 5. Distribuição do número total alimentos implicados em surtos humanos, verificados na UE em 2009 (Adaptado de: EFSA Journal, 2011).

1.3 Qualidade e Segurança Alimentar

Um dos marcos fundamentais da evolução em termos de Segurança Alimentar, foi a criação do *Codex Alimentarius* em 1963, organização internacional conjunta da FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) e da WHO (*World Health Organization*) (Bernardo, 2006), o qual constituiu a primeira compilação de orientações de boas práticas e recomendações relacionadas com a segurança alimentar para a protecção do consumidor, reconhecidas internacionalmente (FAO/WHO, 1999).

O *Codex Alimentarius* constitui uma referência mundial e uma autoridade para os consumidores, produtores e transformadores de bens alimentares, organismos oficiais de controlo e para o comércio internacional de produtos alimentares. A sua influência, numa óptica de harmonização de normas, conceitos e procedimentos, estende-se a todos os consumidores e à garantia de práticas comerciais leais. A Comissão do *Codex Alimentarius*, frequentemente referida como *Codex*, é um corpo intergovernamental que integra, actualmente, 173 países membros e uma organização membro – a União Europeia (Queimada, 2007).

Em 2004, a Organização Mundial de Saúde alertou para uma possível confusão entre os conceitos *Food Safety* e *Food Security* (WHO, *European Series*, n.º 96, 2004 in Araújo, 2007).

O conceito *Food Safety* tem um grande impacto na actualidade devido à necessidade de cumprir certos padrões de qualidade, como é o caso do sistema HACCP. *Food Safety* é, assim, “garantia que um alimento não causará dano ao consumidor – através de perigos biológicos, químicos ou físicos – quando é preparado e/ou consumido de acordo com o uso esperado” (*Codex Alimentarius Commission*, 2003). O FSIS (*US Food Safety Inspection Service*) e o IFPRI (*International Food Policy Research Institute*) consideram que apenas terão lugar no *Food Safety* os perigos acima referidos mas que resultaram de contaminação accidental, não voluntária (IFPRI, 2003; FSIS, 2005 in Araújo, 2007).

O conceito *Food Security* mais amplo e flexível, surgiu na década de 70 do século passado, aquando da crise alimentar global. Na *World Food Conference* de Roma, em 1974, subentendia-se o conceito como uma “disponibilidade permanente de adequado abastecimento mundial de géneros alimentícios básicos para manter uma expansão

regular do consumo alimentar e compensar as flutuações da produção e preços”, tendo evoluído desde então (Araújo, 2007).

Na década de 80 a FAO ampliava o conceito *Food Security*, mencionando que este deveria “assegurar que todas as pessoas tenham permanentemente acesso físico e económico aos alimentos básicos de que necessitam” (FAO, 2002. *The State of the Food Insecurity, 2001 in Araújo, 2007*). Englobando desta forma quatro dimensões: disponibilidade, acesso físico e económico, estabilidade dos abastecimentos e acesso e utilização de alimentos seguros e saudáveis.

1.4 Enquadramento Legislativo da Segurança Alimentar

Conforme consta no Regulamento (CE) N.º 178/2002 de 28 de Janeiro, entende-se por “legislação alimentar”, as disposições legislativas, regulamentares e administrativas que regem os géneros alimentícios em geral e a sua segurança em particular, a nível comunitário e nacional, onde são abrangidas todas as fases de produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios, bem como de alimentos para animais.

O Regulamento (CE) N.º 178/2002 determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios para efeitos da sua colocação no mercado e cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). Estabelece a necessidade da garantia da segurança alimentar em todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios. A produção primária para uso doméstico e a preparação/manipulação/armazenagem domésticas para consumo privado não se incluem neste regulamento (Artigo 1º).

O referido regulamento institui a responsabilização jurídica clara dos operadores das empresas do sector alimentar pela segurança e a rastreabilidade dos géneros alimentícios. O Artigo 17º, do mesmo regulamento define, que os operadores das empresas do sector alimentar e do sector dos alimentos para animais devem assegurar, em todas as fases da produção, transformação e distribuição nas empresas que controlam, que os géneros alimentícios ou os alimentos para animais preenchem os requisitos da legislação aplicáveis, devendo ainda verificar o cumprimento desses requisitos.

Este regulamento harmoniza os requisitos da segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, no Artigo 14º. Assume assim particular significado o conceito de que um género alimentício não será considerado seguro, se for prejudicial para a saúde pública, considerando os seus efeitos a curto, médio ou longo prazo, tóxicos cumulativos e aplicáveis a diferentes categorias de consumidores. São considerados impróprios para consumo humano os que resultam de contaminação, deterioração, putrefacção ou decomposição.

O Artigo 19º refere a obrigatoriedade dos operadores retirarem do mercado os géneros alimentícios que não estejam em conformidade com os requisitos de segurança estabelecidos e ainda informar as autoridades competentes.

A Comissão Europeia, perante a necessidade de actualizar, consolidar e simplificar a diversa legislação existente na área da segurança alimentar, procedeu à sua revisão com o objectivo de aplicar, ao longo da cadeia alimentar, controlos efectivos, fazendo salientar que é da responsabilidade do operador a produção de géneros alimentícios seguros.

Assim, a política comunitária passou a basear-se, explicitamente, em seis princípios base, nomeadamente um elevado nível de protecção da saúde humana, recurso à análise de riscos, adopção de critérios microbiológicos e de controlo da temperatura, elaboração e implementação de Códigos de Boas Práticas de Higiene, controlo da higiene dos géneros alimentícios pelas autoridades competentes e a responsabilização de todos os operadores da cadeia alimentar na comercialização dos géneros alimentícios (Marramaque, 2006).

Esta revisão da legislação deu origem, em 2004, aos Regulamentos (CE) nº 852/2004 e nº 853/2004, relativos à higiene dos géneros alimentícios e aos Regulamentos (CE) nº 854/2004 e nº 882/2004, relativos à actuação das autoridades de controlo oficial. O Regulamento (CE) nº 852/2004 estabelece as regras gerais destinadas aos operadores das empresas do sector alimentar, no que se refere à higiene dos géneros alimentícios, tendo em consideração que eles são os principais responsáveis pela segurança dos alimentos e sublinha a necessidade de garantir esta segurança, ao longo de toda a cadeia alimentar, com início na produção primária, mas também indica que os procedimentos das empresas se devem basear nos princípios de HACCP e Códigos de Boas Práticas, assim como demonstra a necessidade de serem estabelecidos critérios microbiológicos e requisitos de controlo de temperatura baseados numa avaliação científica de risco. Refere ainda que é necessário assegurar que os produtos importados tenham, pelo menos, os mesmos níveis de higiene dos produzidos na União Europeia.

O Regulamento (CE) nº 853/2004 estabelece regras específicas para os operadores das empresas do sector alimentar referentes à higiene dos géneros alimentícios de origem animal. Este regulamento vem complementar as regras previstas no Regulamento (CE) nº 852/2004 e é aplicável aos produtos de origem animal transformados e não transformados.

O Regulamento nº (CE) 882/2004 estabelece regras gerais para a realização de controlos oficiais destinados a verificar o cumprimento de normas que visam, especialmente, prevenir, eliminar ou reduzir para níveis aceitáveis os riscos para

humanos e animais, e garantir práticas leais no comércio dos alimentos para animais e dos géneros alimentícios e defender os interesses dos consumidores, incluindo a rotulagem dos alimentos para animais e dos géneros alimentícios e outras formas de informação dos consumidores. O Regulamento (CE) nº 854/2004 complementa o regulamento anterior, estabelecendo regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano, sendo apenas aplicável às actividades e pessoas a que se aplica o Regulamento (CE) nº 853/2004.

Ainda em 2004, é criada a Agência Portuguesa de Segurança Alimentar (APSA) que tinha como função primeira despertar o País para uma verdadeira cultura de informação e de formação sobre a alimentação, educando o consumidor para as boas práticas, mas também de avaliação científica e consultiva.

Em 2005, foi criado o Regulamento (CE) 2073/2005 relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, que estabelece estes critérios para certos microrganismos e as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do sector alimentar, quando aplicarem as medidas de higiene gerais e específicas referidas no artigo 4º do Regulamento (CE) nº 852/2004. Também em 2005, é criada a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), que iniciou as suas funções em 2006, com a missão clara de ser uma autoridade administrativa nacional especializada no âmbito de segurança alimentar e da fiscalização económica, sendo responsável pela avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, bem como pela disciplina do exercício das actividades económicas nos sectores alimentar e não alimentar, mediante a fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora das mesmas. No ano de 2006, entraram em vigor os regulamentos acima citados, que integram o chamado “Pacote de Higiene”, sendo eles: os Regulamentos (CE) nº 852/2004, nº 853/2004 e nº 854/2004, assim como o Regulamento nº 882/2004.

Aplicação aos Produtos de Pastelaria

Fazendo uma revisão dos diplomas legislativos referentes à Segurança Alimentar na área da pastelaria, constata-se que o Decreto-Lei n.º 4/90, estabelece as características gerais a que devem obedecer os bolos e os cremes de pastelaria. Contudo, este apenas contemplava princípios gerais, remetendo para Portaria a fixação dos critérios microbiológicos a utilizar na apreciação dos bolos e cremes de

pastelaria, bem como a metodologia para a obtenção e constituição das amostras, as condições a observar no fabrico e os requisitos especiais dos locais de fabrico, exposição, armazenagem, transporte e venda destes produtos.

Os critérios microbiológicos a empregar na apreciação das características dos referidos produtos foram fixados pela Portaria n.º 65/90, alterada pela Portaria n.º 1268/95. Todavia, as condições a observar no fabrico de bolos e cremes de pastelaria nunca foram regulamentadas.

Foi aprovado em Conselho de Ministros, o Decreto-Lei nº 41/2009 que, por questões de rigor e coerência, revoga o Decreto-Lei n.º 4/90, a Portaria n.º 65/90 e a Portaria n.º 1268/95. Esta revogação deveu-se ao surgimento dos Regulamentos Comunitários (CE) n.º 852/2004 onde se deliberava as regras gerais destinadas aos operadores das empresas do sector alimentar, referentes à higiene dos géneros alimentícios.

Em 2007, foi criado o Regulamento (CE) nº 1441/2007 que alterou o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 fixando critérios microbiológicos aplicados aos géneros alimentícios, incluindo critérios de segurança aplicáveis aos produtos à base de leite e aos ovoprodutos, sendo que os bolos e os cremes de pastelaria, se enquadravam nesta categoria. Posteriormente o Regulamento (CE) nº 365/2010 da Comissão, de 28 de Abril de 2010, veio alterar o Regulamento (CE) Nº 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios no que diz respeito a *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a *Listeria monocytogenes* no sal alimentar.

Qualidade Microbiológica

No que se refere a alimentos cozinhados prontos a comer, nomeadamente bolos de pastelaria, leites e produtos à base de leite, a lei portuguesa é omissa. Para a avaliação da qualidade microbiológica destes produtos foram criadas linhas de orientação. Os Valores Guia, criados pelo INSA em 2005, servem para identificar situações que permitem qualificar o produto segundo níveis de qualidade e segurança.

O Quadro 6, adaptado da tabela que representa os Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos cozinhados prontos a comer (INSA, 2005), representa o “grupo 1”, dessa mesma tabela, onde se encontram incluídos os bolos.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

A qualidade microbiológica dos alimentos pode ser expressa da seguinte forma: Os resultados do nível **satisfatório** indicam uma boa qualidade microbiológica do alimento, para um nível **aceitável** os resultados indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos, para o **não satisfatório** os resultados indicam que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos e o **inaceitável** ou **potencialmente perigoso** refere a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde pública.

Quadro 6. Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica.

Microrganismo	Qualidade microbiológica (ufc/g)			
	Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável/ potencialmente perigoso
Microrganismos a 30 °C	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	-
<i>Listeria monocytogenes</i>			-	$\geq 10^2$

(Adaptado de: INSA, 2005)

1.5 Análise Sensorial

Segundo a Norma Portuguesa 4263:1994, podemos definir análise sensorial, ou exame organoléptico, como uma análise das características organolépticas de um produto através dos órgãos dos sentidos (visão, olfacto, tacto, paladar e audição), de forma a avaliar os atributos ou características de um produto (Kemp *et al.*, 2009). A análise sensorial é a avaliação de uma ou de várias características de um alimento por apreciação directa (Louro *et al.*, 1988).

A análise sensorial é uma ferramenta moderna muito utilizada, nos dias que correm para o desenvolvimento de novos produtos, reformulação de produtos já existentes no mercado, para o estudo do tempo de prateleira (*vida útil*), na determinação das diferenças e similaridades apresentadas entre produtos concorrentes, na identificação das preferências dos consumidores e na optimização e melhoria da qualidade dos alimentos (ANCIPA, 2010). Os requisitos de fiabilidade, obtidos por via sensorial, deverão, se possível, ser comparados por métodos químicos e físicos (Costell e Duran, 1981 *in* Louro e Nunes, 1988).

Segundo Costell e Duran (1981) os métodos de análise sensorial podem ser divididos em analíticos e afectivos. Os testes analíticos citam diferenças entre produtos ou descrevem uma ou mais das suas características, enquanto que os testes afectivos são utilizados para conhecer a opinião dos consumidores sobre determinado produto.

Os testes analíticos, normalmente, executados por painéis treinados ou semi-treinados e com um número limitado de membros (Louro e Nunes, 1988), dividem-se em dois grupos, os discriminatórios e os descritivos. Os testes discriminatórios são frequentemente utilizados para determinar a probabilidade entre a diferença ou semelhança de amostras. Os testes descritivos podem ser aplicados a uma ou mais amostras a fim de caracterizar qualitativa e quantitativamente, um ou mais atributos sensoriais (norma ISO 6658:2005).

Na realização dos testes sensoriais devem ter-se em conta os aspectos ambientais da prova, assim como outros aspectos de que depende a reacção sensorial dos provadores. Uma sala de provas deverá estar a uma temperatura e humidade relativa agradáveis (20 – 22 °C e 60 – 70 % humidade relativa), com renovação de ar e boa iluminação, de preferência difusa. As cores da sala não deverão ser agressivas (Amerin, 1965 *in* Louro e Nunes, 1988).

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Os gabinetes de prova deverão estar separados entre si (sem serem fechados), de forma a não permitir o contacto entre os juízes de prova. Não necessitam ser grandes, mas devem ter uma mesa onde se procede à prova, um pequeno lavatório, uma janela por onde são admitidas as provas e uma cadeira cómoda. Para além dos aspectos ambientais, existe um certo número de factores relacionados com os orientadores da prova e com a apresentação das amostras que deverão ser tidos em conta para se conseguir uma análise mais eficaz. Os juízes devem estar conscientes que a utilização de perfumes intensos, fumar antes das provas (cerca de 30 minutos antes), ou a acção de outros estímulos fortes podem levar a uma menor concentração dos provadores e, por conseguinte, menor acerto nas apreciações solicitadas.

A apresentação das amostras deverá ser feita com códigos de três números para cada amostra, evitando assim que os juízes produzam inter-relações entre amostras. As diversas amostras em que se pretende analisar uma mesma característica deverão ser apresentadas de forma homogénea, no mesmo tipo de recipiente e a uma temperatura semelhante (Louro e Nunes, 1988).

O método de avaliação sensorial, aplicado pela norma ISO 8587:1988, tem o objectivo de classificar as amostras apresentadas, segundo uma ordem de classificação por intensidade de atributos ou classificação do produto global.

O número de provadores é escolhido conforme o objectivo do teste. Para uma análise estatística dos resultados, quanto maior o número de provadores, maior será a probabilidade de existirem diferenças na classificação dos produtos (norma ISO 8587:1988).

1.6 Tempo de Vida Útil

A vida útil de um alimento é um atributo de qualidade fundamental para o consumidor. Presentemente, a Lei não concede que a vida útil de um alimento seja determinada por aproximação. Desta forma é fundamental a recolha de informações técnicas e científicas que nos permitam conhecer como é que os alimentos evoluem ao longo do tempo de estudo e detectar o momento em que perdem as suas características de qualidade e segurança (ANCIPA, 2010).

O *Codex Alimentarius* define “vida útil” como o período de tempo durante o qual um produto alimentar conserva a sua segurança microbiológica e aptidão para consumo, a uma dada temperatura de armazenamento (FDSAI, 2005).

Existem ainda outras definições. O *Institute of Food Safety and Technology* descreve, vida útil de um alimento como o período durante o qual um alimento é seguro, garantindo as características sensoriais, químicas, físicas e microbiológicas, mantendo o seu valor nutricional, que figura na respectiva rotulagem, quando armazenado nas condições recomendadas. Os produtos que ultrapassaram o prazo de validade podem estar seguros, mas a qualidade não é garantida (Hough, 2010).

No estudo de vida útil, para além das análises microbiológicas, deverá ser desenvolvida uma monitorização das características sensoriais do alimento. De facto, um alimento pode ser microbiologicamente seguro após algum tempo de armazenamento, mas ser rejeitado pelo consumidor devido a alterações nas suas propriedades sensoriais e nutricionais (Hough *et al.*, 2003).

Contudo, como os mecanismos de alteração dos alimentos são complexos e o consumidor tem uma sensibilidade variável a essa alteração, é impossível estabelecer uma definição universal de vida útil de um alimento (Ledauphin *et al.*, 2006).

A vida útil de um alimento depende de diversos factores que afectam o crescimento microbiano nos alimentos. Consequentemente, a associação destes factores determina a natureza da deterioração dos alimentos e os riscos para a saúde (Adams *et al.*, 2008).

Segundo Adams e Moss (2008), os factores que afectam o desenvolvimento de microrganismos encontram-se divididos em quatro classes:

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Os factores intrínsecos são as propriedades físicas e químicas dos alimentos. Como exemplos de factores intrínsecos temos, a actividade da água com uma influência muito importante sobre o crescimento microbiano, o pH, o potencial redox, os nutrientes, a microbiota natural do alimento e a presença de conservantes (Mossel, 1985).

Os factores extrínsecos dizem respeito ao ambiente ou às condições com que o produto final se depara ao longo da cadeia alimentar, como a temperatura de conservação, a humidade relativa, a natureza da atmosfera, a exposição à luz, a manipulação pelo consumidor e as possíveis contaminações microbianas.

Os factores implícitos correspondem às características de um determinado microrganismo e à forma como se comporta em diferentes combinações. Estas combinações podem inibir ou estimular os processos que limitam a vida útil, como exemplo temos, a taxa específica de crescimento, o sinergismo que conduz a alterações do substrato do alimento e ao crescimento de outros microrganismos ou grupo de microrganismos, o mutualismo e o antagonismo, que produzem alterações semelhantes às provocadas pelo sinergismo.

Os factores do processamento provocam consecutivas alterações na microbiota inicial dos alimentos. Os físicos, nomeadamente os tratamentos térmicos têm efeitos letais sobre alguns microrganismos, o que confere inocuidade dos produtos para o consumidor. Os químicos podem provocar alterações na composição química dos alimentos (Mossel, 1985).

A vida útil dos alimentos pode ser influenciada por dois tipos de factores: os factores não microbianos e os de crescimento microbiano.

O crescimento microbiano vai depender da quantidade inicial de microrganismos presentes no alimento, das condições de conservação a que este se encontra exposto, do tempo necessário para que os microrganismos degradem o alimento e de uma posterior contaminação durante a manipulação, embalagem e armazenamento.

Os factores não microbianos reflectem as variadas formas de alteração de qualidade do alimento. Existem muitas formas de alteração da qualidade dos alimentos que podem não resultar na perda de segurança de um produto, mas antes indicar que este deixou de satisfazer determinados requisitos (Food Safety Authority of Ireland, 2006). Como exemplo, a alteração no teor de humidade de um alimento induz à perda de nutrientes, ao escurecimento ou à rancificação; no caso dos alimentos secos, um

acréscimo no teor de humidade conduz a um aumento na vulnerabilidade à acção microbiana (Li, 1999, Fan *et al.*, 2003). A degradação química pode resultar numa alteração do cheiro ou do sabor do alimento, assim como à alteração da cor, escurecimento ou perda de nutrientes (Li, 1999). A exposição à luz pode induzir à rancificação, à perda vitamínica e à perda de cor do alimento (Fan *et al.*, 2003).

Deste modo a avaliação sensorial é bastante importante na determinação da vida útil de muitos géneros alimentícios.

A avaliação sensorial tem diferentes abordagens, consoante se trate da avaliação de um produto industrial ou de um produto tradicional. Isto deve-se ao facto do consumidor actual considerar inaceitável qualquer diferença num alimento industrial, em qualquer fase da sua vida útil, mas em alimentos tradicionais aplica-se o conceito “diferente, mas aceitável” (Hough, 2006).

De acordo com Fan *et al.*, (2003), do ponto de vista sensorial, a vida útil de um alimento não depende exclusivamente dele, mas antes da interacção que se estabelece entre o alimento e o seu consumidor.

1.7 Enquadramento e Justificação deste Estudo

O presente trabalho foi realizado numa empresa de referência no sector de retalho alimentar, na unidade de negócio padaria e pastelaria. Teve como finalidade estudar a vida útil de pastéis sortidos, nomeadamente, o Bolo de arroz, o Mil folhas, o Palmier recheado e o Jesuíta.

A escolha dos pastéis sortidos, baseou-se na análise da quebra em valor, tendo sido escolhidos os quatro produtos que apresentavam a quebra mais acentuada (maior prejuízo para a empresa).

Na empresa onde se realizou o presente estudo, os produtos de pastelaria são responsáveis por 45% das vendas na unidade de negócio padaria e pastelaria, e esta unidade representa um peso de 13% na direcção comercial de perecíveis, onde se inclui também a unidade de frutas e legumes, a unidade de charcutaria, a unidade de pescado e a unidade do talho.

A empresa recebe os diferentes tipos de bolos embalados, em sacos de propileno, colocados em caixas de cartão canelado, que posteriormente são colocados em vitrinas para venda ao público.

Todos os produtos recepcionados se encontravam cozidos e ultracongelados. Os quatro tipos de bolos em estudo pertenciam a fornecedores diferentes e os bolos do mesmo tipo correspondiam ao mesmo lote.

Este tipo de produto é considerado do dia. Os bolos são descongelados de manhã e no final do dia todos os artigos que não foram vendidos são retirados e vão para quebra.

Para a determinação do tempo de vida útil, o descongelamento dos bolos foi feito ao longo de quatro dias consecutivos numa câmara a uma temperatura de 20 °C e com uma humidade relativa de 80%.

A primeira parte do trabalho consistiu na análise microbiológica do produto em análise, ao longo de quatro dias consecutivos, de modo a sua avaliar a possível ingestão segura. Analisados os resultados das determinações microbiológicas e tendo por base os valores guia propostos pelo INSA (2005), fez-se a sua classificação em quatro níveis de qualidade e retiraram-se conclusões relativas ao período de tempo em que estes se consideravam aceitáveis.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

A segunda fase do trabalho, consistiu em fazer determinações do pH e da humidade, como fim de avaliar quais os bolos mais susceptíveis ao crescimento de microrganismos.

Na última etapa do trabalho os bolos que reuniram condições de qualidade e segurança alimentar foram analisados sensorialmente, condição que permitiu concluir a aceitabilidade do produto por parte do consumidor. Em termos sensoriais, foi utilizado um painel de provadores interno da empresa.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

2 Material e Métodos

2.1 Caracterização das Amostras de Pastéis Sortidos

2.1.1 Bolo de Arroz

O bolo de arroz é constituído por açúcar, ovo inteiro, óleo vegetal, farinha de trigo, água, gordura vegetal (óleo de palma refinado, xarope de glucose, caseinato, estabilizador (E451), antiaglomerante (E551), amido modificado de milho, soro de leite em pó, farinha de arroz (1,6%), leite em pó magro, emulsionantes (maltodextrina, E475, E472b, caseinato de sódio, E471, E472e, E170), glúten, levedantes químicos (E500, E450), sal.

2.1.2 Mil Folhas

O mil folhas é constituído por três partes: a massa, o recheio e a cobertura. A massa é constituída por: farinha de trigo, água, margarina (óleo e gordura vegetal hidrogenada, emulsionantes (E471, E332), regulador de acidez (E330), conservante (E202), corante (E160), aromatizante). O recheio é constituído por: água, creme (açúcar, amidos, soro de leite e proteínas lácteas, gordura vegetal hidrogenada, espessante (E401), regulador de acidez (E170), xarope de glucose, emulsionante (E472), conservante (E202), sal, estabilizador (E516), corante (E160), aroma). A cobertura é constituída por: açúcar, água, glucose, chocolate composto (cacau, sacarose, gordura vegetal, emulsionante (E322), aromas). É referido na ficha técnica que pode conter glúten e lactose.

2.1.3 Palmier Recheado

Este produto é composto por duas partes: a massa e o recheio. A massa é constituída por farinha de trigo, água, margarina [óleo e gordura vegetal hidrogenado, água, sal, emulsionante (E471, E332), regulador de acidez (E330), conservante (E202), corante (E160), aromatizante], açúcar, sal.

O recheio é formado por água e creme composto [açúcar, amidos, soro de leite e proteínas lácteas, gordura vegetal hidrogenada, espessante (E401), regulador de

acidez (E170), xarope de glucose, emulsionante (E472), conservante (E202), sal, estabilizador (E516), corante (E160), aroma].

2.1.4 Jesuíta

O produto é composto por três partes: a massa, o recheio e o enfeite. A massa é constituída por farinha de trigo, margarina, água e sal. O recheio é preparado de pastelaria: [[água, açúcar e melhorante: [açúcar, amido modificado, leite em pó, dextrose, espessantes (E401, E516, E450, E339), aroma de baunilha, corantes (E102, E110, E124)], farinha de amêndoa e canela]]. O enfeite é formado por amêndoa em cubos e ovo líquido pasteurizado.

2.2 Aparelhos e Utensílios

De seguida apresenta-se a lista de material utilizado para a realização do trabalho:

- Pipetas graduadas de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL;
- Caixas de Petri;
- Tubos de ensaio;
- Incubadoras a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$; $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Stomacher;
- Sacos de Stomacher;
- Agitador;
- Câmara de fluxo laminar;
- Banho de água termostaticado;
- Balança analítica;
- Excicador;
- Potenciómetro com eléctrodo de medição de pH para amostras sólidas, SCHOTT Instruments, pH-Elektrode Polueline 21 pH.

2.3 Metodologia das Análises Microbiológicas

Nem sempre a presença de microrganismos num alimento significa que existe perigo para a saúde dos consumidores. A sua enumeração é um dos aspectos mais importantes para a determinação da vida útil dos alimentos. Para um estudo de vida

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

útil é importante que se estude inicialmente as características microbiológicas dos produtos em questão para que de forma alguma se coloque em risco o consumidor.

Ao longo de todo o período em que decorreram as análises microbiológicas, foram respeitadas as Boas Práticas de Laboratório e os requisitos constantes na norma ISO 7218:2007. O trabalho foi realizado no laboratório de microbiologia do ISA.

Para a preparação da suspensão-mãe foram retiradas pequenas porções de diferentes partes da amostra, com o auxílio de uma pinça e de um bisturi devidamente esterilizados. As amostras foram colocadas, respectivamente, em sacos esterilizados de Stomacher e adicionadas de um diluente, para que os microrganismos presentes no interior ou à superfície da amostra fossem transferidos para a fase líquida (diluente). A homogeneização foi feita através de processos mecânicos, com recurso ao Stomacher, de forma a garantir uma homogeneização correcta. Obteve-se assim uma suspensão inicial (10^{-1}).

De modo a tornar possível a contagem dos microrganismos existentes numa quantidade conhecida de produto, são efectuadas diluições decimais sucessivas para redução do número de microrganismos por unidade de volume.

O esquema do procedimento utilizado para a descongelação de bolos para análise encontra-se descrito na Fig. 6. Descongelaram-se quatro tipos de bolos em quatro dias consecutivos, sendo realizada a análise microbiológica dos bolos com os diferentes tempos e após descongelação, no último dia. Para a realização do estudo, como já foi referido, todo o produto foi descongelado numa câmara a 20 °C e com uma humidade relativa de 80%.

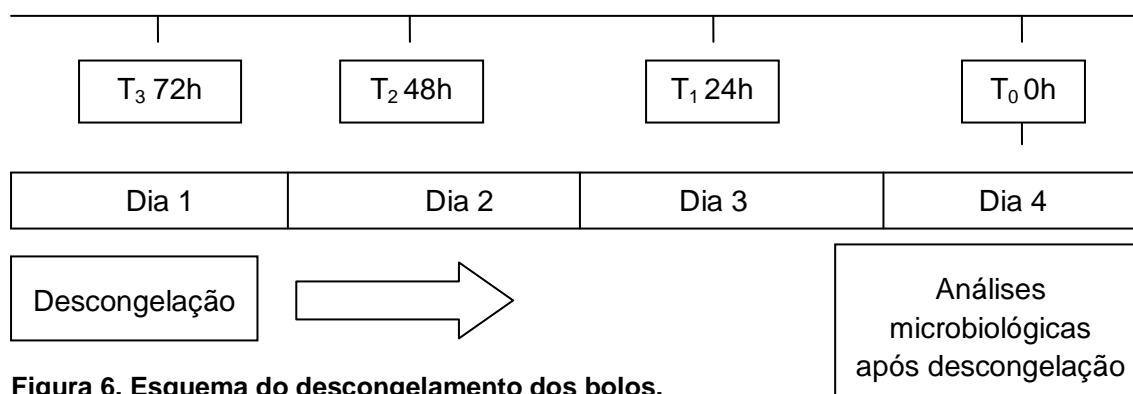


Figura 6. Esquema do descongelamento dos bolos.

2.3.1 Método Utilizado na Contagem de Microrganismos Aeróbios

Mesófilos a 30 °C

Foi realizada a determinação do número total de microrganismos, por contagem de colónias desenvolvidas num meio de cultura sólido, após incubação a 30 °C \pm 1 °C em aerobiose durante 72 horas. Seguiu-se o procedimento descrito na norma ISO 4833:2003. O diluente utilizado foi a solução de Triptona Sal (TS), diluente genérico e o meio de cultura usado foi *Plate Count Ágar* (PCA), ambos foram esterilizados, em autoclave, a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

Antes de iniciar a análise dos produtos, o meio de cultura acabado de esterilizar foi colocado em banho de água a uma temperatura de 44 °C a 47 °C.

Na preparação da suspensão-mãe (diluição 10^{-1}), colocou-se num saco Stomacher, 10 g de produto e adicionou-se 90 mL de diluente. Levou-se a mistura a homogeneizar num Stomacher.

Procedeu-se à realização das diluições decimais, transferindo-se 1 mL da suspensão-mãe para um tubo de ensaio com diluente (9 mL de TS). Homogeneizou-se e, assepticamente, com uma nova pipeta retirou-se 1 mL da diluição 10^{-2} , para um novo tubo de ensaio. Repetiu-se o procedimento até à diluição 10^{-4} .

Depois de se ter obtido as diluições necessárias procedeu-se à inoculação das placas por incorporação. Com uma pipeta esterilizada, mediu-se um inóculo de 1 mL da suspensão-mãe para duas caixas de Petri. Repetindo-se este procedimento para as restantes diluições. Desta forma, homogeneizou-se o tubo de ensaio da última diluição e retirou-se assepticamente 1 mL para uma caixa de Petri esterilizada e devidamente identificada. Repetiu-se esta operação para todas as diluições por ordem decrescente.

Terminada a distribuição do inóculo pelas caixas, verteu-se para cada uma dessas caixas cerca de 15 mL do meio de cultura, agitando-se bem em vários sentidos, cada uma das placas. Deixaram-se solidificar as placas dentro da câmara de fluxo laminar, em superfície horizontal.

Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram colocadas em posição invertida numa estufa a 30 °C \pm 1 °C. Observaram-se as placas após 72 horas, e procedeu-se à contagem do número de colónias, das placas que apresentavam valores compreendidos entre 15 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em

número de unidades formadoras de colónias por grama (UFC/g). O esquema do procedimento efectuado encontra-se na (Fig.7).

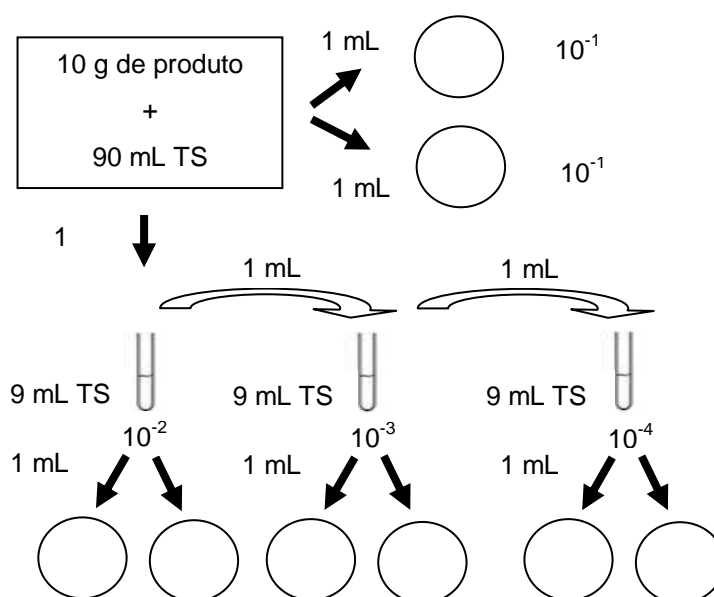


Figura 7. Procedimento para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos.

2.3.2 Método Utilizado na Contagem de *Listeria monocytogenes*

Para a contagem de *Listeria monocytogenes*, seguiu-se o procedimento experimental descrito na norma ISO 11290-1:2005, aplicável para produtos alimentares destinados ao consumo humano ou à alimentação animal.

O diluente utilizado foi a solução de TS, diluente genérico e o meio de cultura usado foi PALCAM, meio de isolamento selectivo para identificação de espécies de *Listeria*. Antes do plaqueamento, ao meio fundido, adicionou-se o suplemento PALCAM.

Para preparação da suspensão-mãe (diluição 10^{-1}), colocou-se num saco Stomacher, 10 g de produto e adicionou-se 90 mL de diluente. Levou-se a mistura a homogeneizar.

Procedeu-se à inoculação de 0,1 mL da suspensão-mãe, por espalhamento, para duas placas com o meio.

Efectuou-se uma nova diluição decimal 10^{-2} , retirando-se assepticamente 1 mL da suspensão-mãe para um tubo de ensaio com o diluente. Homogeneizou-se o tubo e com uma nova pipeta retirou-se assepticamente 0,1 mL da diluição e transferiu-se para a placa com o meio.

As placas foram a incubar a uma temperatura de 37 °C durante 24 a 48 horas. As colónias típicas são pequenas, negras e com uma concavidade central (Fig. 8).



Figura 8. Colónias típicas de *Listeria monocytogenes* em meio PALCAM. Fonte: Biokar, 2002

2.3.3 Método Utilizado na Contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva

O método horizontal para detecção e enumeração de *Staphylococcus coagulase* positiva, foi efectuado conforme a norma ISO 6888-1:1998. Teve como objectivo a contagem do número de colónias desenvolvidas num meio de cultura sólido, após incubação a 37 °C em aerobiose, durante 24 + 24 horas.

O diluente utilizado foi a solução de TS, diluente genérico e o meio de cultura usado foi *Baird-Parker* (BP). Antes da inoculação, ao meio fundido, foi-lhe adicionado um suplemento de gema de ovo (50 mL em 1 000 mL de meio).

O procedimento referente à preparação da suspensão-mãe foi igual ao descrito para *Listeria*.

Preparam-se as placas de meio BP. Após solidificação do meio procedeu-se à inoculação de 0,1 mL da suspensão-mãe, por espalhamento, para duas placas com o meio.

Efectuou-se uma nova diluição decimal 10^{-2} , retirando-se assepticamente 1 mL da suspensão-mãe para um tubo de ensaio com o diluente. Homogeneizou-se o tubo e com uma nova pipeta retirou-se assepticamente 0,1 mL da diluição e transferiu-se para a placa com o meio.

As colónias típicas são pretas ou cinzentas, convexas, brilhantes e rodeadas de um halo claro (Fig. 9).



Figura 9. Colónias típicas de *Staphylococcus aureus*
Fotografia por: Carla Marques.

2.3.4 Método Utilizado na Contagem *Escherichia coli*

Para a detecção de *Escherichia coli* aplicou-se o procedimento experimental descrito na norma ISO 16649-2:2001, onde é especificado um método horizontal para a enumeração de *Escherichia coli* β -glucuronidase-positiva em produtos alimentares destinados ao consumo humano ou à alimentação animal. Esta técnica de contagem de colónias a 44 °C, em meio sólido, contém um substrato cromogénico que permite a detecção da enzima β -glucuronidase.

O diluente utilizado foi a solução de TS, diluente genérico e o meio de cultura usado foi *tryptone-bile-glucuronic* (TBX), as colónias típicas neste meio são de cor azul.

O procedimento referente à preparação da suspensão-mãe foi igual ao descrito para a *Listeria*.

Prepararam-se as placas de meio TBX. Após solidificação do meio procedeu-se à inoculação de 0,1 mL da suspensão-mãe, por espalhamento, para duas placas com o meio.

Efectuou-se uma nova diluição decimal 10^{-2} , retirando-se assepticamente 1 mL da suspensão-mãe para um tubo de ensaio com o diluente. Homogeneizou-se o tubo e

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

com uma nova pipeta retirou-se assepticamente 0,1 mL da diluição e transferiu-se para a placa com o meio.

As placas com o meio TBX foram a incubar, invertidas a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Fig. 10).

Na Fig.11 encontra-se o esquema do procedimento utilizado para a contagem de *Listeria*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

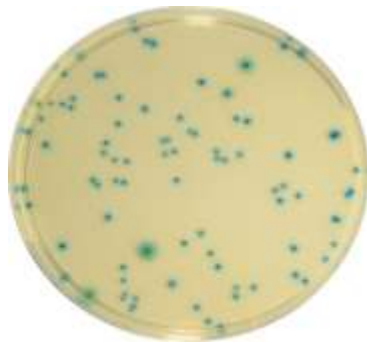


Figura 10. Colónias típicas em meio TBX de *Escherichia coli*. Fonte: Biokar. 2010.

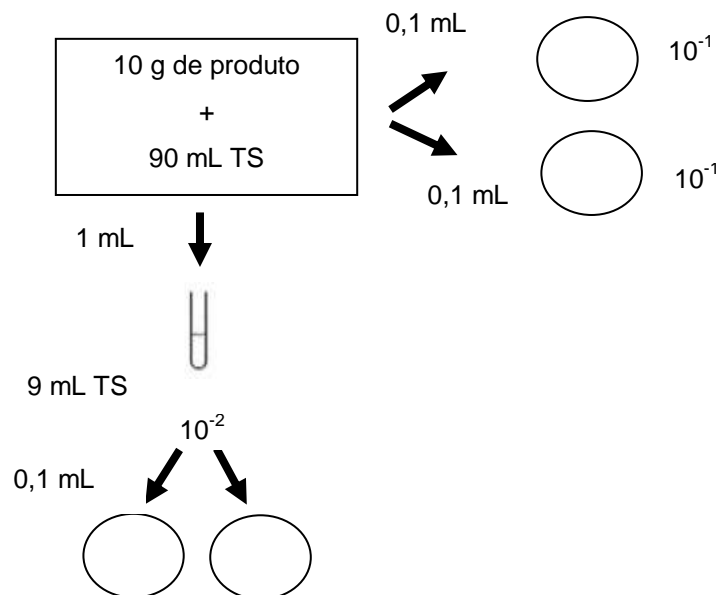


Figura 11. Procedimento utilizado para contagem de *Listeria*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2.3.5 Método Utilizado na Pesquisa de *Salmonella* spp.

De acordo com a norma ISO 6579:2002, para a pesquisa de *Salmonella* spp., foram colhidos 25 g de amostra. Realizou-se um pré-enriquecimento não selectivo em meio líquido, com 225 mL de Água Peptonada Tamponada. A suspensão-mãe foi a incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

Após este período de incubação, efectuou-se a inoculação em meio líquido selectivo. Inoculou-se 0,1 mL da suspensão-mãe para um tubo de ensaio com 10 mL de meio *Rappaport-Vassiliadis Soja Broth*, (RVS broth) e 1,0 mL da suspensão-mãe para num tubo com 10 mL de meio *Muller-Kauffmann Tetrathionate Broth*, (MKTTn broth). Posteriormente foram a incubar, respectivamente, a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante cerca de 24 ± 3 horas.

De cada um dos meios selectivos líquidos retirou-se uma pequena porção do inóculo, com o auxílio de uma ansa descartável e fez-se um riscado na superfície dos dois meios de enriquecimento selectivos sólidos, *Xylose lysine deoxycholate agar* (XLD) e *Brilliant green agar* (VBM). As placas foram a incubar, em posição invertida, a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas.

Os meios selectivos inoculados Rappaport e MKTT, foram a incubar mais 24 ± 3 horas à mesma temperatura e repetiu-se o procedimento nos meios selectivos sólidos mencionados anteriormente. As placas foram examinadas ao fim de 24 horas de incubação e assinaladas as colónias típicas ou atípicas.

As colónias típicas de *Salmonella* spp. em meio XLD apresentam um centro preto e uma zona ligeiramente transparente de cor avermelhada, devido à mudança de cor do indicador. Em meio VBM o meio de cultura fica ligeiramente rosa com colónias transparentes (Fig. 12).



Figura 12. Colónias típicas de *Salmonella* nos meios XLD e VBM.
Fotografias por: Carla Marques.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

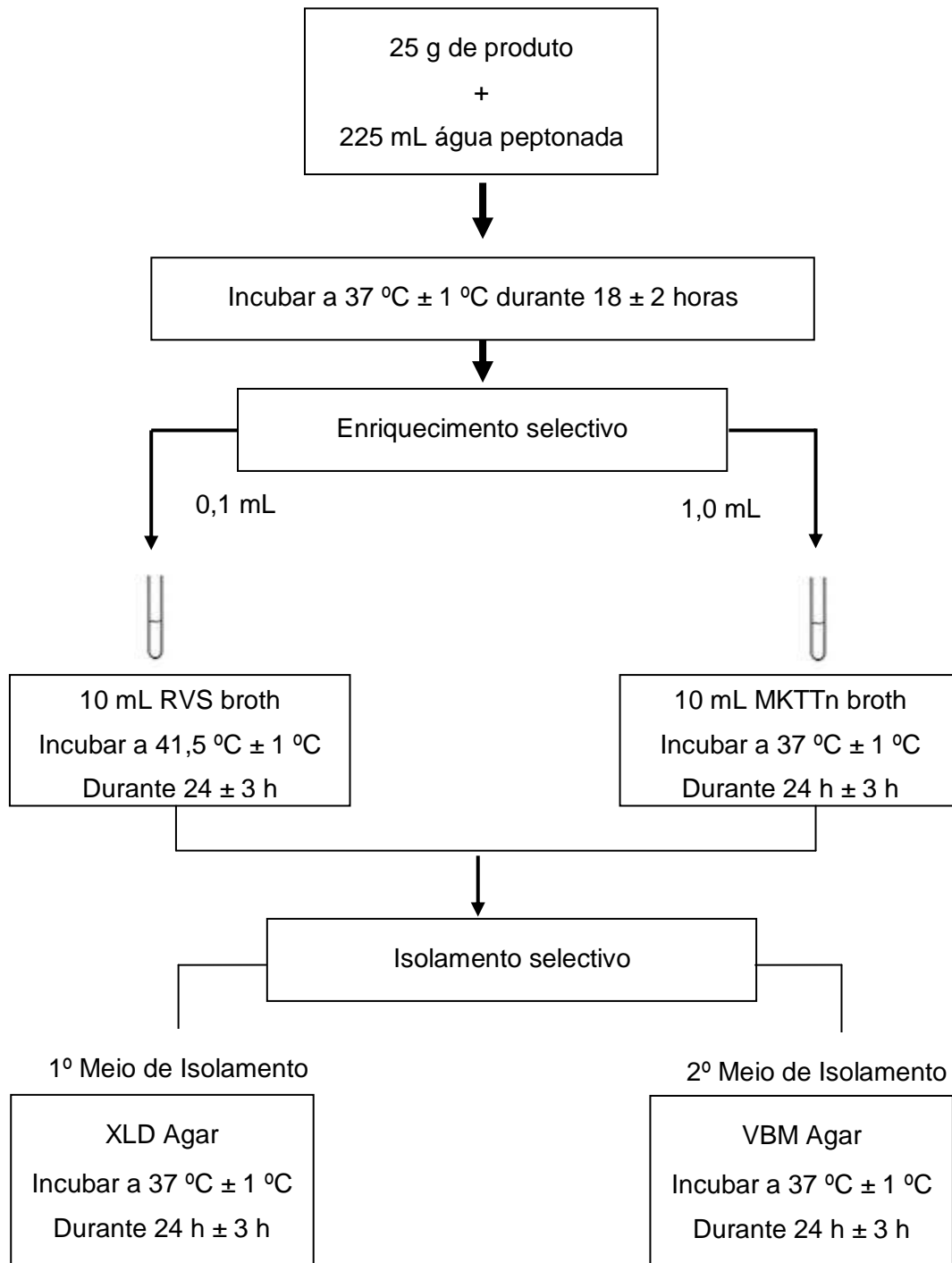


Figura 13. Procedimento efectuado para a pesquisa de *Salmonella* spp.

2.4 Metodologia das Análises Físico-Químicas

Os factores de maior importância para o crescimento microbiano nos alimentos são, o pH e a humidade.

O pH foi determinado através do potenciómetro com eléctrodo de medição de pH para amostras sólidas. A técnica aplicada consistiu em aplicar directamente nas amostras o eléctrodo de pH para sólidos, previamente calibrado com soluções tampão de referência. Os valores de pH obtidos foram registados após estabilização do aparelho.

Para determinar a humidade, em base seca e em base húmida de cada um dos quatro tipos de bolos para os quatro dias retirou-se, com o auxílio de um bisturi e de uma pinça, uma pequena fracção de cada bolo, onde se incluía uma porção de cada um dos seus constituintes (recheio, cobertura e massa). Depois de pesadas em balança analítica, as amostras foram colocadas em caixas de Petri previamente secas e taradas, numa estufa a 100 °C, até massa constante. Após este período, foram retiradas e arrefecidas num excicador, durante aproximadamente 30 minutos. Seguidamente, foram de novo pesadas para verificação da massa perdida. A diferença entre a massa na primeira e na segunda pesagem corresponde à massa de água contida na amostra. Estes valores permitem determinar o valor da humidade da amostra, em base húmida (x) e em base seca (X), através das equações seguintes:

Humidade em Base Húmida (%)

$$x = \frac{\text{massa de água}}{\text{massa de amostra}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Humidade em Base Seca (%)

$$X = \frac{\text{massa de água}}{\text{massa de matéria seca}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

2.5 Metodologia da Análise Sensorial

Com a finalidade de avaliar as alterações sensoriais que os bolos apresentaram ao longo dos quatro dias, após a descongelação, foi realizada uma prova de ordenação (*ranking*), onde foi pedido aos provadores para colocarem por ordem de preferência as quatro amostras referentes a cada dia. Este tipo de análise foi efectuado para os tipos de bolo que obedeceram aos parâmetros microbiológicos de referência.

As respostas foram registadas numa ficha de provas, na qual o provador assinalou a ordem de preferência das amostras, numa escala de 1 a 4, onde o 1 corresponde à amostra que se gosta menos e o 4 à amostra preferida.

Como já foi referido a prova sensorial foi realizada na empresa onde se realizou o estágio e o painel de provadores era interno. A sala de prova, com três cabines individualizadas, foi mantida sob condições adequadas para a realização da mesma (temperatura de 22 °C, ambiente insonorizado e sem cheiros estranhos).

As amostras foram servidas em pratos de plástico brancos e descartáveis, encontrando-se estes codificados com 3 algarismos aleatórios. Foram dadas aos provadores as quatro amostras de cada bolo (meio bolo por provador), em simultâneo e de forma aleatória.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análises Microbiológicas

3.1.1 Microrganismos Aeróbios Mesófilos a 30 °C

O Quadro 7 indica a contagem de Mesófilos Totais (UFC/g) nos diferentes bolos analisados e nos diferentes tempos, nos primeiros lotes de bolos.

Quadro 7. Contagem de Mesófilos Totais (UFC/g) nos diferentes bolos e nos diferentes tempos, nos primeiros lotes analisados.

Tempo (dias)	UFC/g de Bolo			
	Bolo de arroz	Mil folhas	Palmier recheado	Jesuíta
0	$1,0 \times 10^1$	$2,4 \times 10^4$	$8,8 \times 10^3$	$3,0 \times 10^1$
1	$2,7 \times 10^2$	$1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^1$
2	0	$2,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^8$	0
3	5	$7,4 \times 10^4$	$>3,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^1$

Nota: Os resultados destacados pelos rectângulos vermelhos, correspondem a valores Não satisfatórios, para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer, segundo os Valores Guia propostos pelo INSA, conforme Quadro 6.

Comparando os valores obtidos nas análises realizadas, com os dos Valores Guia propostos pelo INSA, verifica-se que o Jesuíta apresenta valores Satisfatórios ($\leq 10^2$ UFC/g) ao longo dos quatro dias.

No caso do Bolo de arroz, os resultados foram Satisfatórios para todos os tempos, excepto, no dia um, onde apresentou valores Aceitáveis ($>10^2 \leq 10^4$ UFC/g).

O Palmier recheado no tempo zero apresentou valores Aceitáveis e nos restantes tempos valores Não satisfatórios. ($> 10^4$ UFC/g). O Mil folhas é o único bolo que apresentou valores Não satisfatórios em todos os tempos.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Através da análise ao Quadro 7, verificou-se que o valor das contagens de Mesófilos Totais, não aumentou progressivamente do primeiro para o último dia, tal deve-se ao facto, de embora do mesmo lote, cada amostra corresponder a um bolo diferente.

A Fig. 14 apresenta uma placa incontável, relativamente à contagem de microrganismos Mesófilos.



Figura 14. Placa incontável de mesófilos.
Fotografia por: Carla Marques

Devido ao elevado número de colónias de mesófilos, nos bolos com recheio (Mil folhas e Palmier recheado), realizaram-se análises a outros bolos, de lotes diferentes, para avaliação da possibilidade da realização das análises sensoriais a estes tipos de bolos.

De forma a facilitar as contagens, nestas segundas análises as amostras foram sujeitas a um maior número de diluições. No tempo zero, foram feitas diluições decimais até 10^{-5} e nos restantes tempos diluições até 10^{-6} .

Todavia, os resultados obtidos apresentavam valores semelhantes aos resultados das análises anteriores (Quadro 8). Apenas o Palmier recheado do dia zero apresentava valores Aceitáveis, todos os restantes valores apresentavam um nível de qualidade microbiológica Não satisfatório, pelo que se excluiu a análise sensorial a estes bolos.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Quadro 8. Contagem de Mesófilos Totais (UFC/g) nos diferentes bolos e nos diferentes tempos, nos segundos lotes analisados.

Tempo (dias)	UFC/g de bolo	
	Mil folhas	Palmier recheado
0	$1,2 \times 10^4$	$6,9 \times 10^3$
1	$7,8 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$
2	$>3,0 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^8$
3	$>3,0 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^8$

Nota: Os resultados destacados pelos rectângulos vermelhos, correspondem a valores Não satisfatórios, para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer, segundo os Valores Guia propostos pelo INSA, conforme Quadro 6.

Os bolos sortidos são sujeitos a um processo térmico durante a sua confecção. Esta fase de tratamento elimina grande parte de potenciais microrganismos existentes. No entanto, os bolos acima referidos cujos resultados foram não satisfatórios, na fase final de confecção, são recheados com creme o que submete este alimento a um maior risco de desenvolvimento microbiano, não só devido ao aumento do a_w como também estão sujeitos a uma maior manipulação por parte dos operadores, aumentando a probabilidade de contaminação por utensílios, por superfícies, pelos próprios manipuladores ou por contaminação cruzada.

Apesar de terem sido analisados bolos de dois lotes de Mil folhas e de Palmier recheado, respectivamente, e de ambos não apresentarem resultados satisfatórios, não podemos generalizar este problema, pois apenas um estudo mais aprofundado poderia indicar o motivo da contaminação verificada. Não se podem também generalizar os resultados Não satisfatórios, obtidos, e generalizar para estes tipos de bolos, pois cada bolo, foi analisado apenas para um fornecedor.

3.1.2 *Listeria monocytogenes*

Nas análises efectuadas para a contagem *L. monocytogenes*, foram encontradas, no palmier recheado com um dia, colónias pretas em meio PALCAM características deste tipo de microrganismo. Para confirmar a presença de *Listeria monocytogenes*, foi efectuado o teste em meio ALOA. Os resultados verificaram-se positivos na diluição 10^{-2} com $N= 2,0 \times 10^3$ UFC/g. Comparando os valores obtidos, com os Valores Guia proposto pelo INSA, o Palmier recheado apresentou qualidade microbiológica Inaceitável e Potencialmente perigosa para a Saúde Pública. Sendo este um critério de segurança os bolos foram excluídos das provas sensoriais.

Os restantes bolos não apresentaram resultados indicadores deste tipo de bactéria patogénica.



Figura 15. Colónias de *Listeria monocytogenes* em meio PALCAM.
Fotografia por: Carla Marques.

Nas análises efectuadas ao segundo lote (mil folhas e palmier recheado) verificou-se que estes não apresentavam colónias características de *Listeria* spp.

3.1.3 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Em todos os bolos, à excepção do jesuíta, existiam colónias pretas sem halo (Fig. 16). Embora as colónias não fossem características de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, fez-se o teste de confirmação, em plasma de coelho. Confirmou-se então que as colónias pretas não eram *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Na análise do segundo lote (Mil folhas e Palmier recheado) verificou-se novamente a existência de colónias que também não eram características, não sendo efectuado nenhum teste de confirmação.

Não se verificam a existência de colónias de *Escherichia coli*.

Na pesquisa de *Salmonella* spp. não houve formação de colónias características deste tipo de microrganismo.



Figura 16. Colónias pretas detectadas na detecção de *Staphylococcus aureus*, em meio selectivo BP. Fotografia por: Carla Marques

3.2 Análises Físico-Químicos

3.2.1 Determinação do pH

Para determinação do pH dos bolos foi efectuada a média de três leituras realizadas. (Quadro 9).

Quadro 9. Valores médios de pH dos bolos.

Bolo	pH			
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Bolo de arroz	6,07	6,21	6,46	6,33
Mil folhas				
Cobertura	- ⁽¹⁾	4,84	5,56	5,40
Recheio	6,86	6,77	6,23	6,02
Massa	- ⁽²⁾	-	5,28	-
Palmier recheado				
Recheio	5,95	6,24	5,27	5,30
Massa+ Recheio	5,53	5,94	5,12	5,16
Jesuíta	5,76	5,58	5,71	5,45

⁽¹⁾ Não foi possível ler o pH, a cobertura era muito fina e dura.

⁽²⁾ Não foi possível ler o pH, pois a massa não era compacta.

3.2.2 Determinação da Humidade

A humidade é determinada através da diferença das médias das pesagens de cada bolo antes e após a ida à estufa. O Quadro 10 apresenta os valores da água evaporada em cada uma das amostras nos diferentes tempos.

A partir das Equações 1 e 2, construíram-se os Quadros 11 e 12 que apresentam em percentagem a humidade em base húmida e a humidade em base seca, respectivamente.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Quadro 10. Média de água evaporada em cada amostra.

Média de água evaporada nas amostras (g)				
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Bolo de arroz	0,4080	0,4552	0,2224	0,4797
Mil folhas	0,5456	0,5300	0,5900	0,7892
Palmier recheado	0,5729	0,6189	0,5426	0,4858
Jesuíta	0,3607	0,3901	0,3472	0,3144

Quadro 11. Média da humidade em base húmida.

Média da humidade em base húmida (%)				
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Bolo de arroz	20,3852	21,6365	11,0121	23,5218
Mil folhas	25,4816	24,2142	26,6396	38,6645
Palmier recheado	27,9900	31,6694	26,8514	23,9973
Jesuíta	18,0311	19,0355	17,1282	15,4533

Quadro 12. Média da humidade em base seca.

Média da humidade em base seca (%)				
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Bolo de arroz	25,6047	27,6105	12,3748	30,7562
Mil folhas	34,1950	31,9508	36,3133	63,0377
Palmier recheado	38,8697	46,3474	36,7080	31,5743
Jesuíta	21,9975	23,5110	20,6684	18,2778

Alguns dos factores de maior importância na alteração dos alimentos são o pH e a humidade.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Grande parte dos produtos de pastelaria tem valores de pH superiores a 4,6, condições favoráveis ao crescimento de bactérias.

Relativamente às leituras de pH efectuadas, todos os bolos encontravam-se na gama de produtos pouco ácidos (4,6 - 7,0), valores óptimos para o crescimento de bactérias patogénicas.

O estudo da humidade é importante porque a sua variação pode conduzir a alterações nos alimentos que levam à rejeição do produto. Os bolos que perderam maior quantidade de humidade foram os bolos recheados, situação normal pelo facto de o recheio ser constituído por uma grande percentagem de água. Nos alimentos, a quantidade de água presente pode ser expressa, quer numa base húmida, quer numa base seca, conforme apresentado nos Quadros 11 e 12.

Comparando os valores do Quadro 10 com os comentários relativos às observações dadas por cada provador, na análise sensorial, foi possível verificar que o Jesuíta com três dias, foi o bolo que perdeu menor massa de água após secagem (0,31 g aproximadamente), sendo que alguns provadores comentaram que este era o bolo mais seco e rijo, comparativamente aos quatro Jesuítas apresentados.

No Bolo de arroz não se verificou uma perda gradual de água, mas os comentários relativos aos bolos dos dias dois e três eram de que a superfície do bolo estava dura e que apresentava alguma gordura.

3.3 Análise Sensorial

Após obtenção dos resultados microbiológicos, efectuou-se a comparação com os Valores Guia criados pelo INSA, para avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos cozinhados prontos a comer, em estudo. Através da comparação dos valores obtidos com os valores tabelados, verificou-se que apenas o Bolo de arroz e o Jesuíta apresentavam qualidade microbiológica para realização dos testes sensoriais, sendo que o Mil folhas e o Palmier recheado não estavam conformes.

Os códigos atribuídos ao Bolo de arroz foram: 743 correspondente ao bolo do dia, 148 para o bolo com um dia, 216 no caso do bolo com dois dias e 382 para o bolo com três dias.

Para o Jesuíta os códigos atribuídos foram: 793 para o bolo do dia, 168 referente ao bolo com um dia, 256 é o código do bolo com dois dias e 347 para o bolo com três dias.

A partir das classificações atribuídas por cada provador, a cada bolo, construiu-se um quadro com os valores atribuídos a cada um dos bolos (Quadro 13 e 14).

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Bolo de arroz

Quadro 13. Classificações atribuídas a cada amostra por provador ao Bolo de arroz.

Provador	Ordem de classificação				Σ Classificações
	382 (dia 3)	216 (dia 2)	148 (dia 1)	743 (dia 0)	
1	2	1	4	3	10
2	1	3	2	4	10
3	1	2	4	3	10
4	1	2	3	4	10
5	1	2	4	3	10
6	2	3	1	4	10
7	1	2	3	4	10
8	1	2	3	4	10
9	1	2	4	3	10
10	1	2	4	3	10
11	1	2	3	4	10
12	1	2	4	3	10
13	3	1	2	4	10
14	1	4	2	3	10
15	2	1	4	3	10
16	1	2	3	4	10
17	3	1	2	4	10
18	1	4	2	3	10
19	1	2	4	3	10
20	1	2	3	4	10
21	1	3	2	4	10
22	1	2	3	4	10
23	1	2	4	3	10
24	1	2	3	4	10
25	1	2	3	4	10
Soma das classificações	32	53	76	89	250

Estes resultados foram tratados de acordo com a norma ISO 8587:1988. Procedeu-se ao cálculo do valor de Friedman (eq. 3), de modo a avaliar se há diferenças significativas entre as diferentes amostras de bolo, a nível de apreciação sensorial.

$$F = \frac{12}{JP(P+1)} \times (R1^2 + R2^2 + \dots + Rp^2) - 3J(P+1) \quad (\text{eq. 3})$$

F – número de Friedman

J- Número de provadores (25)

P- Número de amostras (4)

R1+R2+...Rp- Soma das classificações atribuída a cada amostra (P) pelos (J) provadores.

Assim, o F calculado para o bolo de arroz, substituindo os valores da Eq.3, foi o seguinte:

$$F=45,72$$

Após o cálculo do valor de Friedman, comparou-se este valor com os valores críticos da distribuição do χ^2 , que se encontram na tabela 4 da norma ISO 8587:1988.

Se o valor de Friedman calculado fosse superior ao valor tabelado na norma, as amostras eram estatisticamente diferentes a nível sensorial.

O valor tabelado para o nível de significância $\alpha=0,05$ foi de 7,81 que é inferior ao valor calculado de $F=45,72$. Para $\alpha=0,01$ o valor foi de 11,34 que é também inferior a 45,72. Com base nestes resultados, concluiu-se que as amostras eram estatisticamente diferentes ao nível sensorial, com um grau de confiança de 99%.

Apesar de as amostras serem sensorialmente diferentes, podiam existir amostras que fossem semelhantes entre si. Para tal, compararam-se as amostras duas a duas, utilizando-se a aproximação à distribuição normal, que é dado pelas seguintes proposições (norma ISO 8587:1988):

$$\text{Para } \alpha= 0,05 \quad |Ri - Rj| > 1,960 \times \sqrt{\frac{JP(P+1)}{6}} \quad (\text{eq. 4})$$

$$\text{Para } \alpha=0,01 \quad |R_i - R_j| > 2,576 \times \sqrt{\frac{JP(P+1)}{6}} \quad (\text{eq. 5})$$

Sendo R_i e R_j a diferença das pontuações das amostras i e j respectivamente.

- **Comparação das amostras 743 e 148 (bolo do dia com o bolo com 1 dia)**

Com 95% de confiança ($\alpha=0,05$)

Aplicando a equação 5, o valor obtido para $\alpha=0,05$ foi de 13. Como o valor tabelado para este nível de significância é de 17,89, podemos concluir que as amostras no dia zero (do dia) e com 24 horas eram sensorialmente idênticas, com um risco de erro de 5%.

- **Comparação das amostras 743 e 216 (bolo do dia com o bolo com 2 dias)**

Com 95% de confiança ($\alpha=0,05$)

Aplicando a equação 4 o valor obtido para $\alpha=0,05$ foi de 36. Como o valor tabelado para este nível de significância é de 17,89, podemos concluir que as amostras no dia zero (do dia) e com dois dias eram sensorialmente diferentes entre si, com um risco de erro de 5%.

Neste caso, como existem diferenças significativas entre o bolo do dia e o bolo com dois dias, prevê-se que também existam diferenças significativas entre o bolo do dia com o bolo de três dias.

Bolo Jesuíta

Os resultados foram tratados estatisticamente de acordo com a norma ISO 8587:1988, tal como descrito para o Bolo de arroz. No Quadro 14 podemos observar as classificações atribuídas a cada um dos quatro bolos apresentados aos provadores.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Quadro 14. Classificações atribuídas a cada amostra por provador ao Jesuíta.

Provador	Ordem de classificação				Σ Classificações
	347 (dia 3)	256 (dia 2)	168 (dia 1)	793 (dia 0)	
1	2	1	3	4	10
2	1	3	2	4	10
3	2	1	3	4	10
4	2	1	4	3	10
5	2	1	4	3	10
6	2	1	3	4	10
7	1	2	4	3	10
8	2	1	4	3	10
9	1	2	3	4	10
10	1	2	3	4	10
11	1	2	4	3	10
12	2	1	3	4	10
13	1	3	2	4	10
14	2	1	3	4	10
15	1	2	4	3	10
16	2	1	3	4	10
17	1	2	3	4	10
18	1	2	3	4	10
19	2	1	3	4	10
20	2	1	3	4	10
21	2	1	3	4	10
22	1	2	3	4	10
23	1	2	3	4	10
24	2	1	4	3	10
25	2	1	4	3	10
Soma das classificações	39	38	81	92	250

Tal como para o Bolo de arroz procedeu-se ao cálculo do valor de Friedman (eq. 3). O valor calculado neste caso foi igual a 56,72.

O valor tabelado do χ^2 para o nível de significância $\alpha=0,05$ foi de 7,81 inferior a $F=56,72$. Para $\alpha=0,01$ registou-se o valor de 11,34 também inferior a $F=56,72$, o que determinou que as amostras eram estatisticamente diferentes a nível sensorial, com um grau de confiança de 99%. Como no Bolo de arroz também para o Jesuíta utilizaram-se as aproximações à distribuição normal.

- **Comparação das amostras 793 e 168 (bolo do dia com o bolo com 1 dia)**

Com 95% de confiança ($\alpha=0,05$)

Aplicando a equação 4, o valor obtido para $\alpha=0,05$ foi de 11. Como o valor tabelado para este nível de significância é de 17,89, podemos concluir que as amostras do dia e as amostras com 24 horas eram sensorialmente idênticas, com um risco de erro de 5%.

- **Comparação das amostras 793 e 256 (bolo do dia com o bolo com 2 dias)**

Com 95% de confiança ($\alpha=0,05$)

Aplicando a equação 4, o valor obtido para $\alpha=0,05$ foi de 54. Como o valor tabelado para este nível de significância é de 17,89, podemos concluir que as amostras do dia e com dois dias eram sensorialmente diferentes entre si, com um risco de erro de 5%.

Neste caso, como existem diferenças significativas entre o bolo do dia e o bolo com dois dias, prevê-se que também existam diferenças significativas entre o bolo do dia com o bolo de três dias, tal como se verificou com o Bolo de arroz.

4 Conclusão

A vida útil dos produtos alimentares, nomeadamente na área da pastelaria, constitui uma parte integrante da Segurança Alimentar e as empresas do sector devem promover estudos, de forma a averiguar a conformidade destes produtos.

As principais alterações que ocorrem nos produtos de pastelaria são de origem microbiológica, física e química. O pH, a a_w e a humidade deste tipo de produtos são factores que influenciam grandemente as suas transformações. Grandes partes das contaminações existentes nestes produtos devem-se a contaminações cruzadas, devido à má manipulação dos alimentos, ingredientes já contaminados e a más condições higio-sanitárias.

Os agentes responsáveis pela maioria dos surtos de origem alimentar foram *Salmonella* enterica, as toxinas e os vírus, cujos dados mais recentes reportados por Portugal, em 2009, revelaram 251 ocorrências das quais 90 necessitaram de tratamento hospitalar. Reconhecendo esta preocupação, manifestada pela Organização Mundial de Saúde, os países desenvolvidos, adoptaram medidas no sentido de normalizarem e controlarem os efeitos negativos, desde o produtor até ao consumidor final.

O tempo de vida útil de um alimento é designado pelo período durante o qual este poderá ser consumido sem que apresente riscos microbiológicos e que por outro lado seja aceite pelo consumidor a nível sensorial. É estabelecido a partir de testes laboratoriais, para determinar a evolução microbiana, e de testes sensoriais que caracterizam o parecer do painel de provadores.

O presente trabalho foi realizado numa empresa de referência no sector de retalho alimentar, na unidade de negócio padaria e pastelaria. Teve como finalidade estudar a vida útil de pastéis sortidos, nomeadamente, o Bolo de arroz, o Mil folhas, o Palmier recheado e o Jesuíta. Todos os produtos recepcionados se encontravam cozidos e ultracongelados. Para a determinação do tempo de vida útil, o descongelamento dos bolos foi feito ao longo de quatro dias consecutivos numa câmara a uma temperatura de 20 °C e com uma humidade relativa de 80%.

A primeira parte do trabalho consistiu na análise microbiológica do produto em análise, ao longo de quatro dias consecutivos, de modo a avaliar a sua possível ingestão segura.

Determinação da vida útil de pastéis sortidos

Efectuada a comparação dos resultados das análises microbiológicas, dos bolos em estudo, com os Valores Guia propostos pelo INSA, verificou-se que o Palmier recheado e o Mil folhas apresentaram, após 24 horas, valores de qualidade microbiológica Não satisfatórios. Face aos resultados obtidos, analisaram-se outros bolos, pertencentes a um lote diferente. Todavia, os resultados obtidos apresentaram valores semelhantes, ficando estes dois tipos de bolos excluídos da fase seguinte.

Numa outra etapa do trabalho os bolos que reuniram condições de qualidade e segurança alimentar (Bolo de arroz e Jesuíta) foram analisados sensorialmente por um painel de provadores interno da empresa.

A partir das classificações atribuídas pelos provadores, ao bolo de Arroz e ao Jesuíta, procedeu-se ao cálculo do valor de Friedman, de modo a avaliar se havia diferenças significativas entre as diferentes amostras, tendo-se chegado à conclusão de que os bolos do dia zero e os bolos com 24 h após descongelação eram sensorialmente idênticos ($p > 0,05$), pelo que satisfaziam as exigências do consumidor. Relativamente à confrontação da análise entre os bolos do dia zero e os bolos correspondentes a outros tempos após a descongelação, verificou-se que os mesmos eram sensorialmente diferentes, segundo o método aplicado no estudo. Deste modo, podemos afirmar que, face aos resultados obtidos, o Jesuíta e o Bolo de Arroz devem ser consumidos, no máximo, até 24 horas após o seu descongelamento, conforme é aplicado actualmente.

Para conclusões mais precisas sobre estes tipos de bolos deveriam ter sido feitas mais análises ao mesmo tipo de bolos do mesmo fornecedor e de fornecedores diferentes. Ao serem analisados apenas dois lotes, do mesmo fornecedor, não foi possível tirar conclusões exactas acerca deste tipo de bolo. No entanto, os resultados apresentados colocam sérias preocupações relativas à Segurança Alimentar de bolos de pastelaria com cremes.

5 Referências bibliográficas

- Adams, M. R.; Moss, M. O. (2000). Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. 2^{sd} edition. University of Surrey, Guildford, UK.
- Araújo, M. (Novembro de 2007). Safety e Security. Conceitos diferentes. Revista de Segurança e Qualidade Alimentar. Nº3: p.62-63 Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-03/Page%2062-63.pdf>>. Acesso em: 15-03-2011.
- Codex Alimentarius Commission (1999). Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life. CAC/ RCP 46.
- Bernardo, F. (Novembro de 2006). Perigos sanitários nos alimentos. Revista de Segurança e Qualidade Alimentar. N.º1 p.8. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-01/SEQUALI-01.pdf>>. Acesso em: 10-03-2011.
- European Food Safety Authority (2011). The European Union Summary on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA Journal 2011; 9 (3):2090.
- European Food Safety Authority (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. The EFSA Journal, 2010 8 (1):1496.
- Fan, X., Niemira, B. A. e Sokorai, K. J. B. (2003). Use of ionizing radiation to improve sensory and microbial quality of fresh-cut green onion leaves. Journal of Food Science, 68, pp. 1478 – 1483.
- FAO/WHO 1999, Understanding the Codex Alimentarius FAO and WHO Information Division. Disponível em <<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/publications/reports/en/index.html>> Acesso em: 25-03-2011.
- FAO/WHO (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical report. Microbiological Risk Assessment Series N.º 5.
- Food Safety Authority of Ireland (2005). Determination of Product Shelf-life Guidance Note N.º 18. Disponível em: <www.fsai.ie/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=756>. Acesso em 02-05-2011.
- Forsythe, S. J. (2002). Microbiologia da Segurança Alimentar. 1ª edição, Artmed. Porto Alegre.
- Forsythe, S. J. (2000). The microbiology of safe food. Oxford Blackwell Science.
- Garbutt, J. (1997). Foodborne diseases and food poisoning. In Essentials of Food Microbiology. Ed. Copyright Licensing Agency. P. 135-181.

- Garitta, L., Gómez, G., e Curia, A. V. (2005). Metodologia estadística de supervivencia. Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos. Food Quality and Preference (17), pp. 53 - 69.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Millilo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. and Sauders B. D.(2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int J Syst Evol Microbiol, Vol. 60, pp. 1280-1288.
- Hays, P. R. (1995). Food Microbiology and Hygiene. 2nd edition. Chapman & Hall. Department of Microbiology, University of Leeds, UK.
- Hozová, B., Turicová, R. and Lenkeyová, I. (2002), Microbiological and sensory quality of stored croissant-type bakery products depending on external (sorbic acid) and internal (dough, aw value) conditions Food / Nahrung, 46: 144–150.
- Hough, G. (2010). Sensory Shelf Life Estimation of Food Products. CRC Press Taylor& Francis Group, New York.
- Hough, G. (2006). Sensory shelf-life testing. Food Quality and Preference, 17, pp. 640-645.
- Hough, G., Langhor, K., Gomez, G. e Curia, A. (2003). Survival analysis applied to sensory shelf life of foods. Journal of Food Science, 68, 359 – 362.
- Hui, Y. H.; Pierson, M. D.; Gorham, J. R. (2001). Foodborne Disease Handbook. 2nd edition, revised and expanded. Volume 1: Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York.
- Infoancipa – Informação ANCIPA – Outubro 2010 (p.14-15). Disponível em: <www.ancipa.pt>. Acesso em: 20-04-2011.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1996) Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Pathogens. Blackie Academic & Professional. New York.
- Jay, J. M. (1992). Modern Food Microbiology. 4th edition. Chapman & Hall, New York, NY.
- Jay, J. M. (2000). Modern Food Microbiology. 6th edition. Chapman & Hall Inc., New York, NY.
- Jay, J. M.; Loessner M. J.; Golden D. A. (2005). Modern Food Microbiology. ISBN 0387231803. 7th edition. Springer Science+ Business Media. New York.
- Kemp, S. E., Hollowood, T., & Hort, J. (2009). *Sensory Evaluation*. Wiley -Backwell: A practical Handbook p.66-70.

- Lacasse, D. (1995). Introduction à la Microbiologie Alimentaire. Les éditions Saint-Martin. ISBN:972-771-102-2.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. and Allerberger, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. Int J Syst Evol. Microbiol. 2009, Vol. 60 pp. 2210-2214.
- Ledauphin, S., Pommeret, D., Qannari, E. M. (2006). A Markovian model to study products shelf-lives. Food Quality and Preference, 17, pp. 598 – 603.
- Lelieveld, H. L. M., Mostert, M. A. & Holah, J. (2005). Handbook of hygiene control in the food industry. Editora Woodhead Publishing Limited.
- Li, C. T., Wick, M., Marriott, N.G. (1999). Evaluation of Lipid Oxidation in Animal Fat. Research and Reviews: Meat. The Ohio State University Special Circular, pp. 172-199.
- Louro, L.; Nunes, J.C. (1988). Análise sensorial em alimentos. Ministério da Indústria e Energia, Lisboa, LABORATÓRIO Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. Instituto de tecnologia Industrial Departamento de Tecnologia das Industrias Alimentares. DTIA N.º 95, estudos e Documentos – 33 p. 1-6.
- Lund, B. M.; Baird-Parker, T. C.; Gould, G. W. (2000). The Microbiological Safety and Quality of Food. Volume I. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- Marramaque, M. C. (Novembro 2006). Novas exigências legais - Aplicação prática. Revista de Segurança e Qualidade Alimentar, nº 1, p. 24-26. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-01/SEQUALI-01.pdf>>. Acesso em: 15-03-2011.
- Mossel, D. A. A.; García, B. M. (1985). Microbiologia de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Primera edición española. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- Mossel, D. A. A.; Corry, J. E.; Struijk, C. B.; and Baird, R. (1995). Essentials of the Microbiology of Foods. John Wiley and Sons, New York, NY.
- NORMA ISO 4833:2003. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes - Technique par comptage des colonies à 30 °C.
- NORMA ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- NORMA ISO 6888-1:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

NORMA ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.

NORMA ISO 11290-1:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.

NORMA ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide.

NORMA ISO 6658:2005 International Standard – Sensory analysis –Methodology- General guidance.

NORMA ISO 8587:1988 Sensory analysis -- Methodology – Ranking.

Norma Portuguesa 4263 (1994) Análise Sensorial - Vocabulário. Instituto Português da Qualidade, Lisboa.

Queimada, M. A. M. Q. (Maio de 2007) Codex Alimentarius - Dos antepassados à actualidade. Revista de Segurança e Qualidade Alimentar. N.º2: p.43-45. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-43-45.pdf>>.

Santos, M. I.; Correia C.; Cunha, M. I. C.; Saraiva, M. M.; Novais, M. R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. INSA. Lisboa.

Smith, J. P. (1992). Bakery products. In Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food. R.T. Parry (ed), Blackie Academic and Professional, London, UK.

Smith, J. P.; Difas, D. P; El-Khoury, W.; KouskouTSAis, J.; El-Khoury, A. (2004). Shelf Life and Safety Concerns of Bakery ProductTSA – a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44:19-55.

Soares, E. (Maio de 2007). Doenças de origem alimentar - Infecções e Intoxicações. Segurança e Qualidade Alimentar , p. 6-8. Disponível em: <<http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/n02-06-09.pdf>>. Acesso em: 15-03-2011.

Regulamento (CE) n.º 178/2002 de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Jornal oficial da União Europeia n.º L31. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. Jornal oficial da União Europeia n.ºL139. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.

- Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal oficial da União Europeia n.º L226. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 854/2004 de 29 de Abril de 2004, estabelece as regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. Jornal oficial da União Europeia n.º L139. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 882/2004 de 29 de Abril de 2004, relativo aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais. Jornal oficial da União Europeia n.º L191. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 2073/2005 de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal oficial da União Europeia n.º L338/1. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Jornal Oficial da Comunidade Europeia L322/12.
- Regulamento (CE) n.º 365/2010 da Comissão, de 28 de Abril de 2010, que altera o Regulamento (CE) N.º 2073/2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios no que diz respeito a *Enterobacteriaceae* no leite pasteurizado e noutros produtos lácteos líquidos pasteurizados e a *Listeria monocytogenes* no sal alimentar. Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 107/9.
- Regulamento Diário da República, 1.ª série – N.º 29-11 de Fevereiro de 2009. Disponível em: <<http://dre.pt/pdf1s/2009/02/02900/0092200923.pdf>>. Acesso em: 07-05-2011
- Silliker, J. H., Bair-Parker, A. C., Bryan, F. L., Christian, J. H. B., Roberts, T. A. & Tompkin, R. B. (1991). El sistema de analisis de riesgos y puntos criticos – su aplicación a las industrias de alimentos. Espanha: Editorial Acribia.
- Soares, E. 2007. Qualidade e Segurança Alimentar. Doenças de origem alimentar. Infecções e intoxicações. Segurança e Qualidade Alimentar, 2: 6-8.
- World Health Organization (2008). Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf> Acesso em: 05-04-2011.